



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EPIDEMIOLOGIA DA ANTIBIORRESISTÊNCIA  
EM CANÍDEOS E SUA RELEVÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA

MARIA MARGARIDA E OLIVEIRA ALGEÓS SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo  
Pina Nunes

ORIENTADOR

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo  
Pina Nunes

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro  
de Oliveira

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EPIDEMIOLOGIA DA ANTIBIORRESISTÊNCIA  
EM CANÍDEOS E SUA RELEVÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA

MARIA MARGARIDA E OLIVEIRA ALGEÓS SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo  
Pina Nunes

ORIENTADOR

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo  
Pina Nunes

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro  
de Oliveira

2018

LISBOA

---

*We have more to learn from animals than animals have to learn from us.*

- A.D. Williams

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, o meu maior exemplo a seguir na vida. É impossível exprimir em tão poucas linhas o tanto que ambos significam para mim. Obrigada por estarem sempre presentes e pelo amor incondicional que sempre me deram.

À Ana Azedo, Soraia Martins e Joana Silva a minha elite de sempre e para sempre. Obrigada pelos anos de amizade incondicional.

À Maria Sara Santos e à Margarida Ferrador, as melhores amigas que medicina veterinária me podia ter dado. Obrigada por todos os momentos e experiências que partilhámos, pela alegria, diversão e cumplicidade, sem pudores e restrições, porque “não somos obrigadas a nada”.

A todos os meus colegas que me acompanharam nesta aventura que é o mestrado em Medicina Veterinária, mas um especial obrigada à Carolina Cássio, à Filipa Rocha, à Joana Zanatti, à Sara Calisto, à Inês Costa, à Ana Cristina Vítor, à Catarina Sozinho e à Madalena Ribeiro.

Ao meu orientador, o mestre Telmo Nunes, o verdadeiro guru da FMV. Obrigada pela genialidade, criatividade, pelos conselhos e apoio. Obrigada pela paciência e disponibilidade foi sem dúvida um excelente orientador.

À minha co-orientadora, a professora doutora Manuela Oliveira, a professora mais *jedi* de sempre. Obrigada por ser uma editora incrível e pelas horas passadas no laboratório de volta dos TSA. Para além de ter sido uma ótima co-orientadora revelou ser uma ótima pessoa.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, a todos um muito obrigada pelo vosso apoio e ajuda, mas um especial obrigada à Carla Carneiro, Miguel Grilo e Eva Cunha, o vosso contributo foi essencial para a realização deste trabalho.

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Restelo, obrigada pela oportunidade de integração na vossa equipa e pelos conhecimentos transmitidos na área de clínica e cirurgia de animais de companhia.

À minha Lexie, a minha *setter* irlandesa. Obrigada por me mostrares que realmente ainda temos muito que aprender com os animais.

## Resumo

### **Epidemiologia da antibiorresistência em canídeos e sua relevância para a saúde pública**

Um dos principais problemas de saúde pública atuais é a disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos a nível mundial, para o qual a resolução requer uma abordagem “Uma Só Saúde”. Em medicina veterinária, bactérias com resistências a antibióticos com importância hospitalar em medicina humana, têm vindo a ser frequentemente isoladas a partir de amostras de canídeos. Porém, existem poucos estudos focados na epidemiologia de *Escherichia coli* isolada de cães saudáveis e sem exposição prévia a antibioterapia.

Este estudo epidemiológico transversal foi realizado a partir de amostras retais de uma população canina da região de Lisboa, e teve como objetivo a identificação dos fatores de risco decorrentes do contacto entre pessoas e animais associados à ocorrência de isolados de *E. coli* multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e panresistentes (PDR) em cães saudáveis sem exposição prévia a antibioterapia. Foi aplicado um questionário aos tutores dos cães incluídos no estudo, de forma a obter um conjunto de informações relacionadas com as características, individuais e ambientais, que poderiam constituir potenciais fatores de risco para a ocorrência de resistência antimicrobiana nos isolados de *E. coli* obtidos através de métodos bacterianos convencionais. A análise dos dados foi realizada recorrendo a análise univariada e multifatorial.

Os isolados de *E. coli* demonstraram elevada multirresistência (71,4%), sendo que 23,8% foram caracterizados como extensivamente resistentes e 12,1% como panresistentes. A cefalexina (83,10%), ácido nalidíxico (62,10%) e tetraciclina (60,10%) foram os antibióticos para os quais se observou uma maior prevalência de resistência dos isolados de *E. coli*.

Neste estudo foi demonstrado que os cães sénior, os cães com acesso livre ao exterior e os cães cujo tutor frequenta o meio hospitalar de medicina humana têm um menor risco de ser portadores de estirpes de *E.coli* resistentes a antimicrobianos, comparativamente com cães sem estas características.

A identificação de potenciais fatores de risco para a ocorrência de antibiorresistência é essencial para a implementação futura de programas de controlo e prevenção de resistências antimicrobianas em medicina veterinária.

**Palavras-Chave:** Saúde Pública; Epidemiologia; Fatores de Risco; Animais de Companhia; *Escherichia coli*; Resistência Antimicrobiana.

## ***Abstract***

### **Epidemiology of antimicrobial resistance in dogs and its relevance to public health**

The dissemination of antimicrobial resistance has become a major public health concern worldwide for which a "One Health" approach is required. In veterinary medicine, bacteria resistant to critically important antibiotics for human medicine, have been frequently isolated from canine samples. However, there are few studies focused on the epidemiology of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs and without previous exposure to antibiotics.

A cross-sectional epidemiological study was conducted and rectal samples were obtained from a canine population in the Lisbon region with the aim of assessing household risk factors associated with the occurrence of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug-resistant (PDR) *E. coli* isolates from healthy dogs without previous exposure to antibiotics.

The owners of the dogs included in the study were asked to fill out a questionnaire in order to obtain data on the individual and environmental characteristics which could be potential risk factors for the occurrence of antimicrobial resistance in *E. coli* isolates obtained through conventional bacterial methods. Data analysis was performed using univariate and multivariate analysis.

A high proportion of *E. coli* isolates (71,4%) were classified as MDR, 23,8% were classified as XDR and 12,1% were classified as PDR. Cephalexin (83.10%), nalidixic acid (62.10%) and tetracycline (60.10%) were the antibiotics for which a higher prevalence of resistance of *E. coli* isolates was observed.

In this study it was shown that senior dogs, outdoor dogs and dogs whose owner attends human healthcare facilities have a lower risk of being carriers of resistant *E. coli* strains when compared to pets without these characteristics.

The identification of potential risk factors related to antimicrobial resistance occurrence is essential for the future implementation of antimicrobial stewardship programs in veterinary medicine.

**Keywords:** Public Health; Epidemiology; Risk Factors; Companion Animals; *Escherichia coli*; Antimicrobial Resistance

## Índice

I. Descrição das atividades desenvolvidas durante o período de estágio .....	1
II. Revisão Bibliográfica: Saúde Pública e Antibiorresistências.....	5
1. Avaliação da problemática numa perspectiva “Uma Só Saúde” .....	5
1.1. Impacto atual.....	7
1.2. Antibiorresistência em Medicina Humana.....	11
1.3. Antibiorresistência em Medicina Veterinária.....	13
1.3.1. Animais de Produção .....	15
1.3.2. Animais de Companhia .....	18
1.4. Determinantes de antibiorresistência .....	20
1.5. Fatores de risco associados a antibiorresistências em isolados de animais de companhia ..	24
2. <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.1. Modelo bacteriano para estudos de antibiorresistência .....	27
2.2. Antibióticos relacionados com resistência em <i>Escherichia coli</i> .....	28
3. Objetivos do estudo .....	31
III. Materiais e Métodos .....	32
1. Seleção dos indivíduos a incluir no estudo .....	32
2. Recolha da Amostra e preenchimento do Questionário .....	34
2.1. Recolha da amostra.....	34
2.2. Questionário.....	34
2.2.1. Desenvolvimento Concetual .....	34
2.2.2. Teste e Validação.....	35
2.2.3. Aplicação.....	35
3. Isolamento, identificação e conservação de isolados de <i>E. coli</i> .....	36
4. Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos .....	37
5. Análise Estatística.....	40
IV. Resultados .....	42
1. Caracterização da população em estudo.....	42
2. Fatores de risco associados a uma exposição prévia a antibiótico.....	45
3. Caracterização das resistências antimicrobianas apresentadas pelos isolados.....	47
3.1. Prevalência .....	47
3.2. Padrões e perfis de resistência a antimicrobianos.....	48
4. Fatores de risco associados à ocorrência de antibiorresistência .....	54
4.1. Ocorrência de pelo menos um isolado MDR, XDR e PDR por animal (n=62).....	54
4.2. Resistência ao nível do isolado (n=248).....	57



V. Discussão dos Resultados.....	63
5.1. Limitações do estudo.....	72
5.2. Perspetivas futuras.....	72
VI. Conclusão .....	74
Bibliografia.....	75
Anexos .....	85

## Índice de Figuras

Figura 1. Consumo de antibióticos para uso sistêmico na comunidade. Países EU/EEE, 2017. (Expresso como DDD per 1000 habitante per dia).....	9
Figura 2. Consumo de Antibióticos pelos animais de produção. Estimativa para 2013.....	16
Figura 3. Mudança de padrão de consumo de antibióticos em animais de produção (%). Estimativa para 2030. ....	17
Figura 4. Relação entre o resistoma do meio ambiente natural e do meio ambiente contaminante e potenciais vias de transferência de bactéria MDR (multirresistente). Reservatório: Bactérias do meio ambiente natural que detêm genes resistentes a antibióticos que podem ser transferidos a bactérias clinicamente relevantes. Portador: Maioritariamente bactérias do ambiente contaminante com elevada capacidade de aquisição e transferência horizontal de genes de resistência. Vetor: Bactérias comensais e bactérias de relevância clínica presentes em animais, com elevada capacidade de aquisição de genes de resistência a antibióticos por transferência horizontal. Agente patogénico MDR: agentes com elevada capacidade de infeção e de causar doença.....	23
Figura 5. Placas de TSA, com meio <i>Müller-Hinton</i> e discos dos vários antibióticos em estudo: enrofloxacin (1), gentamicina (2), trimetoprim+sulfametoxazol (3), cloranfenicol (4), ampicilina (5), amikacina (6), cefalexina (7), amoxicilina + ácido clavulânico (8), cefotaxima (9), estreptomicina (10), ácido nalidíxico (11), Imipenem (12), tetraciclina (13). ....	39

## Índice de Fluxogramas

Fluxograma 1. Desenho do estudo. Um total de 91 amostras retais foram recolhidas de cães nunca sujeitos a antibióterápia prévia. Dessas 91 amostras fecais, 29 foram excluídas, uma vez que em nenhuma das culturas realizadas se registou a presença de <i>E. coli</i> . Foram utilizados para análise através de TSA um total de 248 isolados de <i>E. coli</i> obtidas a partir de 62 amostras. ....	33
---	----

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. <i>Escherichia coli</i> . Distribuição de isolados totalmente suscetíveis e de isolados resistentes a um, dois, três, quatro e cinco grupos antimicrobianos (incluindo aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos) .....	29
Gráfico 2. Idade da população em estudo. Idade definida por estratos: Jovem, Adulto e Sênior .....	43
Gráfico 3. Características gerais da população em estudo (Estado de Saúde, Desparasitado, Vacinado e Esterilizado) .....	43
Gráfico 4. Antibioterapia prévia realizada pela população em estudo.....	43
Gráfico 5. Exposição a antibioterapia prévia segundo a idade do animal (n=141). .....	44
Gráfico 6. Situação subjacente que condiciona a administração do antibiótico à amostra em estudo. ....	44
Gráfico 7. Prescrição efetuada a conselho de Médico Veterinário Vs Médico de Medicina Humana... ..	44
Gráfico 8. Prevalência de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> agrupados por animal (n=62) a cada antibiótico estudado (ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, Imipenem, tetraciclina e trimetoprim+sulfametoxazol) .....	51
Gráfico 9. Prevalência da resistência dos isolados de <i>E. coli</i> agrupados por animal (n=62) segundo os padrões de resistência MDR, XDR e PDR .....	51
Gráfico 10. Prevalência da resistência dos isolados de <i>E. coli</i> (n=248) a cada antibiótico estudado (ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, imipenem, tetraciclina e trimetoprim+sulfametoxazol). ....	52
Gráfico 11. Prevalência da resistência dos isolados de <i>E. coli</i> (n=248) segundo os padrões de resistência MDR, XDR e PDR .....	52
Gráfico 12. Prevalência de perfis únicos de antibiorresistência relativamente aos isolados agrupados por animal (n=62).....	53
Gráfico 13. Prevalência da multirresistência nos perfis únicos de antibiorresistências relativamente aos isolados individuais (n=248) .....	53

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Frequência relativa de horas em cada serviço durante o estágio no HVR .....	1
Tabela 2. Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio no HVR .....	2
Tabela 3. <i>Escherichia coli</i> . Número total de isolados invasivos testados e combinações de resistência contra aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos. Países EU/EEE .....	30
Tabela 4. Antibióticos em estudo e respectivas abreviaturas do nome, concentração do disco (µg) e critérios CLSI para o diâmetro do halo (mm).....	38
Tabela 5. Prevalência da suscetibilidade e resistência dos isolados de <i>E. coli</i> relativamente aos antibióticos utilizados (n=248 e n=62.).....	49
Tabela 6. Categorização dos antibióticos testados contra os isolados de <i>E.coli</i> (n=248) de acordo com as categorias de risco da EFSA para a prevalência da resistência. Categorias de risco: rara, <0,1%; muito baixa, 0,1% a 1,0%; baixa,> 1% a 10,0%; moderada, > 10,0% a 20,0%; alta, > 20,0% a 50,0%; muito alta, > 50,0% a 70,0%; e extremamente alta, > 70,0% .....	50
Tabela 7. Comparação de modelos saturados da generalização linear de fatores de risco para os vários tipos de padrões de antibiorresistências observados nos isolados adquiridos por animal (n=62). Variáveis explanatórias incluídas: Idade, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), PasseioTrela, AcessoZeroExt (nenhum tipo de acesso ao exterior), AnimaisCoabitantes, FreqVet (frequência de visitas ao médico veterinário), FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal), TutorAB (exposição do tutor a antibioterapia prévia).....	55
Tabela 8. Modelos finais de generalização linear de fatores de risco para os vários tipos de padrões de antibiorresistências observados nos isolados agrupados por animal (n=62). As variáveis explanatórias incluídas são Idade Jovem, Idade Sênior, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), PasseioTrela e FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal).....	56
Tabela 9. Comparação de modelos de fatores de risco de regressão logística mista simples para os vários tipos de padrões de antibiorresistências apresentados pelos isolados individualmente (n=248). Variáveis explanatórias incluídas: Idade, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), PasseioTrela, AcessoZeroExt (nenhum tipo de acesso ao exterior), AnimaisCoabitantes, FreqVet (Frequência de visitas ao médico veterinário), FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal), TutorAB (exposição do tutor a antibioterapia prévia).....	58
Tabela 10. Modelos finais de fatores de risco de regressão logística mista simples para os vários tipos de padrões de antibiorresistências (MDR, XDR e PDR) apresentados pelos isolados individualmente (n=248). As variáveis explanatórias incluídas são Idade Jovem, Idade Sênior, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), InteraçãoLambeTutor (Cão interage com tutor lambendo) e FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal) .....	60
Tabela 11. Resultados das associações entre as resistências individuais de cada antimicrobiano em estudo apresentados pelos isolados individualmente (n=248) e os potenciais fatores de risco determinados através da regressão logística mista .....	61

## Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

®	Marca registada
µg	Micrograma
°C	Graus Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMF	<i>Access to Medicine Foundation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory and Standards Institute</i>
cm	Centímetro
COS	Meio agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro
DDD	Doses Diárias Definidas
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DHD	DDD/ 1000 habitantes/ dia
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças
EEE	Espaço Económico Europeu
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EMA	<i>Agência Europeia de Medicamentos</i>
ESAC	<i>European Surveillance of Antimicrobial Consumption</i>
ESBL	β-lactamases de espectro alargado
ESVAC	<i>European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption</i>
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização para a Alimentação e a Agricultura
GRA	Genes de Resistência a Antibióticos
HVR	Hospital Veterinário do Restelo
IMViC	Indol-Methyl Red-Voges Proskauer-Citrate
L	Litro
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRSA	<i>Methicilin Resistant Staphylococcus aureus</i>
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCU	<i>Population Correction Unit</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PIB	Produto Interno Interno
PPCIRA	Programa Nacional de Prevenção e Controlo de Infecções e Resistências aos Antimicrobianos
RAM	Resistência Antimicrobiana
T	Toneladas
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>



## I. Descrição das atividades desenvolvidas durante o período de estágio

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa foi realizado em dois momentos e áreas distintas: a clínica e cirurgia de animais de companhia e microbiologia.

### 1. Hospital Veterinário do Restelo

A primeira parte do estágio respetiva às áreas de clínica e cirurgia de animais de companhia teve início a 2 de outubro de 2017 e término a 2 março de 2018, tendo ocorrido no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), hospital de referência na área da grande Lisboa. No total de cinco meses foram contabilizadas cerca de 960 horas.

Como hospital de referência, o HVR, dispõe de diferentes serviços, nomeadamente de medicina interna, nefrologia/hemodiálise, imagiologia (tomografia, radiologia, ultrassonografia), cirurgia, internamento, urgências e consultas de especialidade diversas (ortopedia, neurologia, oftalmologia, dermatologia, animais exóticos, comportamento animal). O HVR disponibiliza os seus serviços 24 horas por dia todos os dias da semana, incluindo fins-de-semana e feriados. À equipa de estagiários é designado quinzenalmente o horário de um médico veterinário, tendo sido possível integrar quase todas as especialidades, como se pode consultar na tabela 1. Foram realizados turnos diurnos, de 8 a 12 horas, bem como turnos noturnos, de 16 horas.

Tabela 1. Frequência relativa de horas em cada serviço durante o estágio no HVR

Área Clínica	Frequência relativa (%) do número de horas em cada serviço (n=960)
Animais exóticos	2%
Cardiologia	10%
Cirurgia	18%
Comportamento Animal	3%
Internamento	15%
Imagiologia	10%
Medicina Interna	20%
Nefrologia/Hemodiálise	2%
Oftalmologia	10%
Oncologia	10%

Durante o período de estágio foram desenvolvidos, aplicados e adquiridos conhecimentos e competências nos diversos serviços de animais de companhia que se encontram descritos e sumarizados na tabela 2. É de salientar o fato de que todas as atividades e procedimentos realizados durante o estágio terem sido supervisionados/acompanhados por médicos veterinários com experiência em cada área clínica.



Tabela 2. Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio no HVR

Área Clínica	Tipos de consulta/Casos acompanhados/Tarefas executadas
Medicina Interna	<p>Primeiras consultas, consultas de medicina preventiva, consultas de rotina, consultas de seguimento, de referência e urgências.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anamnese, Exame Estado Geral, Exames diagnóstico complementares.</li> <li>• Preparação e administração de fármacos.</li> <li>• Realização e interpretação de análises clínicas (hemograma completo, bioquímicas, ionograma e microhematócrito).</li> </ul>
Cirurgia	<p>Cirurgia de tecidos moles (orquiectomias, ovariectomias, laparotomias exploratórias, gastro/enterectomias para remoção de corpo estranho, colocação de tubos esofágicos, resolução de prolapso retal e de infecção dos sacos anais, colocação de <i>bypass</i> ureteral subcutâneo, cistotomia para remoção de cálculos, resolução de anomalias na posição das pálpebras como entrópion e ectrópion, resolução de prolapso da glândula da terceira pálpebra, enucleação, cirurgia de cataratas, resolução de <i>shunts</i> portossistêmicos e remoção de nódulos).</p> <p>Cirurgia Ortopédica (redução de fraturas, correção da rotura do ligamento cruzado anterior).</p> <p>Odontologia (destartarização e extração dentária).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acompanhamento de consultas de avaliação pré-cirúrgica</li> <li>• Preparação e administração de medicação pré-cirúrgica, indução anestésica, preparação do paciente e monitorização da anestesia. Acompanhamento pós cirúrgico.</li> <li>• Assistente do cirurgião.</li> </ul>
Internamento	<p>Acompanhamento de casos clínicos encaminhados da medicina interna ou do seguimento e avaliação pós-cirúrgica.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Discussão de casos clínicos.</li> <li>• Comunicações ao tutor sobre o estado de saúde do animal.</li> <li>• Preparação e realização de altas clínicas e administração de fármacos.</li> <li>• Contenção e monitorização dos animais e a realização de exames físicos.</li> <li>• Colheita de amostras de sangue, realização de análises hematológicas, colocação de cateteres endovenosos e sistemas de venoclise, drenagem de líquido de derrame torácico e abdominal.</li> <li>• Desbridamento de feridas, execução de pensos, remoção de pontos simples.</li> <li>• Medição da glicémia e pressão arterial.</li> <li>• Alimentação dos animais, limpeza das infraestruturas.</li> </ul>
Cardiologia	<p>Insuficiências cardíacas, Malformações congénitas do coração e grandes vasos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Realização e interpretação de ecocardiografias com e sem <i>doppler</i>, radiologia torácica, eletrocardiograma (ECG) e eletrocardiograma <i>Holter</i>.</li> </ul>

Tabela 2 (continuação)

Área Clínica	Tipos de consulta/Casos acompanhados/Tarefas executadas
Imagiologia	<p>Radiologia digital direta, Ultrassonografia, Tomografia Computorizada, Ecocardiografia, Endoscopia.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contenção, posicionamento e sedação (quando necessário) dos animais.</li> <li>• Execução e interpretação de radiografias, ecografias e tomografias.</li> <li>• Assistência na lavagem de <i>bypass</i> ureteral e recolha de urina por cistocentese.</li> <li>• Observação de punções aspirativas por agulha fina e biópsias percutâneas ecoguiada.</li> </ul>
Oftalmologia	Exames oftalmológicos completos. Avaliação de reflexos oculares, teste de <i>Schirmer</i> , tonometria digital, biomicroscopia com a lâmpada de fenda e oftalmoscopia direta e indireta. Exames com colorações específicas (fluoresceína, rosa bengala). Gonioscopia.
Oncologia	<p>Diagnóstico e estadiamento de diversos tipos de cancro. Protocolos de Quimioterapia.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Discussão de casos clínicos</li> <li>• Realização de protocolos de quimioterapia e/ou cuidados paliativos.</li> </ul>
Nefrologia	<p>Sessões de hemodiálise. Colocação e lavagem de <i>bypass</i> ureteral.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Assistência nas sessões de tratamento realizadas.</li> </ul>
Laboratório	<p>Hemograma, análises bioquímicas sanguíneas, ionograma, microhematócrito, provas de coagulação, utilização do refratómetro para determinação de densidade urinária e proteínas totais, testes rápidos de diagnóstico e tipificação sanguínea, urianálise e uroculturas e testes de sensibilidade a antibióticos (TSA).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Realização e interpretação de análises hematológicas, bioquímicas e de urianálises.</li> <li>• Observação ao microscópio ótico de esfregaços sanguíneos e lâminas de citologia.</li> </ul>

O estágio no HVR englobou, também, a execução de trabalhos diversos, tais como apresentações individuais e em grupo relativas a temas específicos relacionados com cada especialidade ou com a atividade de medicina veterinária no geral. Importa ressaltar que durante o estágio em clínica e cirurgia de animais de companhia no HVR, um dos objetivos seria a recolha de amostras e aplicação de questionários necessários para a realização da dissertação de mestrado. No entanto, tal não foi permitido, tendo sido necessário contactar/recrutar outras cinco clínicas e hospitais na região de Lisboa que colaboraram com este projeto de dissertação de mestrado, tornando possível a execução da segunda parte do estágio, realizado na área da microbiologia, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

## **2. Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa**

A segunda parte do estágio na área de microbiologia teve início a 5 de março de 2018 e término no a 22 junho de 2018, tendo sido realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. No total de três meses e meio foram contabilizadas cerca de 350 horas de trabalho prático.

Durante este período de estágio foi desenvolvido o trabalho laboratorial cujos resultados permitiram a elaboração desta dissertação de mestrado. Todos os procedimentos, manuseamento de instrumentos e equipamentos laboratoriais tiveram a orientação da Professora Doutora Manuela Oliveira e a supervisão da microbiologista e técnica do laboratório, Mestre Carla Carneiro.

De entre os procedimentos e técnicas de bacteriologia clínica veterinária efetuadas durante este estágio destacam-se a preparação de meios de culturas, a preparação do material para esterilização, o manuseamento de amostras biológicas, as sementeiras por esgotamento, a técnica de coloração de Gram, o teste da oxidase, os testes IMViC (Indol-Methyl Red-Voges Proskauer-Citrato), a seleção de isolados bacterianos e a realização e leitura de testes de suscetibilidade aos antibióticos.

## II. Revisão Bibliográfica: Saúde Pública e Antibiorresistência

### 1. Avaliação da problemática numa perspetiva “Uma Só Saúde”

O fenómeno da resistência bacteriana a antibióticos é anterior à descoberta dos antibióticos, no final da década de 1950. Estirpes resistentes apareceram muito antes do uso dos antibióticos pelos humanos, sendo uma estratégia que permite a sobrevivência destes microrganismos que apresentam uma capacidade notável de adaptação e evolução e sobrevivência (Acar, Moulin, Page, & Pastoret, 2012; Hu, Gao, & Zhu, 2017). De fato, a presença de genes de resistência a antibióticos (GRA) foi detetada em bactérias antigas presentes no seu habitat natural, por exemplo, em espécies presentes em sedimentos congelados de 30 mil anos de idade (D’Costa *et al.*, 2011, citado por Hu *et al.*, 2017).

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma questão bastante complexa de analisar, não só devido à rápida capacidade de adaptação das bactérias ao seu ambiente, mas também devido à diversidade de espécies animais existentes, à diversidade do ambiente envolvente, ao número de classes de antimicrobianos disponíveis e à diversidade de bactérias patogénicas envolvidas (Acar & Moulin, 2012; Acar *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da capacidade de resistência assenta no princípio de que as bactérias da microbiota humana e animal são expostas a agentes antimicrobianos de diferentes tipos, a diferentes concentrações e frequências de administração/ exposição. Com o passar do tempo, a manutenção da pressão seletiva seleciona as bactérias que desenvolveram mecanismos de resistência específicos para um determinado agente antimicrobiano anteriormente utilizado (Sayah, Kaneene, Johnson, & Miller, 2005).

Após a introdução de antibióticos em saúde humana, saúde animal as bactérias desenvolveram mecanismos para resistir à ação de quase todos os antibióticos descobertos e comercializados até à data. Como consequência desta evolução, tem sido reportado um número crescente de estirpes multirresistentes, com perfis de resistência a múltiplos antibióticos, liderando assim o caminho para uma era pós-antibiótica, de grande preocupação para a saúde pública humana e animal (Hu *et al.*, 2017).

Atualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos problemas de saúde pública mais relevantes, a nível mundial, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, uma vez que muitas bactérias anteriormente suscetíveis aos antibióticos usualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes (Office Internationale des Epizooties [OIE], 2015; World Health Organization [WHO], 2018).

Dado a complexidade da problemática da resistência antimicrobiana tanto na saúde humana como na saúde animal e ambiente a implementação de uma abordagem holística, em consonância com a perspetiva *One Health* - “Uma Só Saúde” - para a resolução do problema é essencial (Gyles, 2016; União Europeia [UE], 2015).

O conceito “Uma só Saúde” aplicada à RAM consiste em reforçar a sua prevenção e o seu controlo nos setores humano, veterinário e ambiental, bem como garantir a disponibilidade e prolongar a eficácia dos agentes antimicrobianos (Gyles, 2016; Lammie & Hughes, 2016; UE, 2015).

A União Europeia (UE) sublinha a importância da cooperação internacional na luta contra a RAM, dada a natureza mundial do problema. A UE apoia e a colabora ativamente com organizações internacionais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), a Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Comissão do *Codex Alimentarius*, a fim de assegurar a criação e a aplicação de medidas e estratégias globais destinadas a restringir o desenvolvimento e a propagação da RAM. O controlo da RAM é uma questão que tem de ser abordada a nível internacional, a fim de minimizar as suas consequências e evolução e deve ser compatível com os acordos internacionais, como os da Organização Mundial do Comércio (OMC) (UE, 2015).

Desta forma, uma abordagem “Um só saúde” ao problema das RAM remete para uma intervenção mais orientada para a saúde como um todo, em detrimento de uma abordagem fragmentada e dispersa, onde se abrangia apenas uma pequena parte do todo (Collignon, 2012a).

### 1.1. Impacto atual

A resistência aos antibióticos tem sido e continuará a ser responsável por consequências clínicas e económicas graves, relacionadas com o aumento da morbilidade e mortalidade, devido a falhas na administração de tratamentos eficazes contra as infeções causadas por bactérias resistentes. Estima-se que a resistência aos antibióticos será responsável por 10 milhões de mortes anuais até 2050 e, consequentemente, por uma redução de 2% a 3,5% no Produto Interno Bruto (PIB) mundial (Hu *et al.*, 2017)

Além disso, a hospitalização prolongada e o uso de antibióticos diferentes dos de primeira linha têm também aumentado, de forma acentuada, bem como os custos associados aos cuidados de saúde, o que constitui um problema particularmente relevante, considerando os recursos finitos que sustentam os sistemas de saúde e tendo em conta a atual conjuntura de crise económica e financeira a nível mundial (Loureiro, Roque, Teixeira Rodrigues, Herdeiro, & Ramalheira, 2016).

Para além de afetar o setor da saúde humana a resistência antimicrobiana afeta também a medicina veterinária e agricultura, constituindo um dos problemas de saúde pública mais urgentes a nível mundial. Nos Estados Unidos da América (EUA), pelo menos 2 milhões de pessoas são infetadas, anualmente, com bactérias resistentes a antibióticos, e pelo menos 23 mil pessoas morrem como resultado dessas infeções (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018; OIE, 2015b).

Tanto a utilização dos antibióticos como a resistência antimicrobiana têm de ser abordados em dois níveis: micro e macro. A nível micro, os clínicos e médicos veterinários devem garantir que os antibióticos prescritos e administrados nos hospitais, comunidades e explorações pecuárias são sempre os mais adequados. A nível macro, a questão é política, sendo de grande complexidade e integrando dois grandes setores públicos, o da saúde e o da agricultura (Zarb & Goossens, 2012).

A grande maioria dos antimicrobianos, especialmente antibióticos, é prescrita por médicos que prescindem de exames de diagnóstico, fornecida por farmacêuticos que prescindem de prescrições médicas ou adquiridas por pacientes que se automedicam e compram antibióticos sem prescrições (Access to Medicine Foundation [AMF], 2018; Currie, King, Nuttall, Smith, & Flowers, 2018; Zarb & Goossens, 2012). Os médicos e outros profissionais de saúde geralmente recorrem ao diagnóstico empírico, fundamentado na sua experiência, intuição e opinião profissional para diagnosticar uma infeção, identificar a sua causa e consequentemente decidir qual o tratamento antimicrobiano mais adequado. Em alguns casos, os exames de diagnóstico são posteriormente usados para confirmar ou alterar essa prescrição. Este processo de decisão permaneceu praticamente inalterado durante décadas, porque o processamento laboratorial de amostras clínicas que confirma a presença de um agente infeccioso e os medicamentos aos quais este é suscetível é lento (entre 36 horas ou mais). Um paciente gravemente doente não pode esperar tanto tempo pelo tratamento, e

mesmo quando os riscos para a saúde não são tão elevados, os profissionais de saúde sofrem uma grande pressão temporal, financeira e por parte dos pacientes que requerem que as suas necessidades sejam supridas o mais rapidamente possível (O'Neill, 2016).

Outra questão importante centra-se nas elevadas quantidades de antimicrobianos, em particular de antibióticos, que são desperdiçadas globalmente em pacientes que não necessitam de antibioterapia, enquanto outros que precisam não têm acesso. Uma mudança na forma como os antibióticos são prescritos e consumidos é fundamental, para prolongar e preservar a utilidade dos produtos existentes e reduzir a urgência de desenvolver novos fármacos (O'Neill, 2016). Atualmente, a prevalência de doenças resistentes a antimicrobianos tem aumentado em velocidade inversamente proporcional ao desenvolvimento e aprovação de novos fármacos. Assim, no que diz respeito às doenças infecciosas, a origem de estirpes resistentes é um dos principais desafios da saúde no século XXI, especialmente em ambientes hospitalares. Em medicina veterinária, embora a quantidade de antibióticos consumidos na pecuária seja quase o dobro da quantidade utilizada pelos seres humanos, o papel dos antimicrobianos veterinários no desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes só começou a ser discutido há relativamente pouco tempo (Silva, Knobl & Moreno, 2013).

Grande parte do interesse no uso de antibacterianos, em Medicina Veterinária centrou-se na sua utilização em animais de produção e eventual disseminação de agentes patogénicos resistentes através da cadeia alimentar (Vaarten, 2012; WHO, 2017). No entanto, o aparecimento de bactérias multirresistentes em animais de companhia chamou a atenção para o uso de antimicrobianos na prática veterinária de animais de companhia, até porque muitos dos fármacos antimicrobianos utilizados neste âmbito são os mesmos ou estão intimamente relacionados com os antimicrobianos utilizados em medicina humana (British Small Animal Veterinary Association [BSAVA], 2017).

Segundo o relatório *Surveillance Report: Surveillance of antimicrobial consumption in Europe* divulgado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*, em 2017, existe uma grande variabilidade no consumo de antibióticos nos diferentes países europeus, avaliado em doses diárias definidas (DDD) / 1.000 habitantes /dia (DHD). Na figura 1 é possível observar que o nível de consumo de antibióticos mais elevado ocorre nos países do sul da Europa, comparativamente com os países do norte da Europa (ECDC, 2017b). Em Portugal, no período entre 2012-2016 a taxa do consumo de antibióticos apresentou uma tendência de decréscimo de 22,7 DHD para 21,6 DHD, e assim Portugal passou a apresentar um consumo mais baixo relativamente a outros países europeus, e inferior à média dos valores de consumo (21,9 DHD) dos países que integram o projeto *European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC)* (ECDC, 2017a) (figura 1).

Figura 1. Consumo de antibióticos para uso sistémico na comunidade. Países União Europeia (UE)/ Espaço Económico Europeu (EEE), 2017. (Expresso como DDD *per* 1000 habitante *per* dia). Adaptado de *Summary of the latest data on antibiotic consumption in the EU* (ECDCControl, 2017a)



No oitavo relatório elaborado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) resultante do projeto *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC), foram apresentados dados referentes a vendas ou prescrições de produtos antimicrobianos médico-veterinários reportados pelos 30 países europeus. Durante os anos de 2010-2016, registou-se uma diminuição geral de 20,1% nas vendas de antibióticos, em 25 países da União Europeia (UE) e nos 5 anos anteriores, as vendas foram de 163 mg/PCU, 154 mg/PCU, 148 mg/PCU, 158 mg/PCU, 141 mg/PCU e 129,4 mg/PCU em 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016 respetivamente (European Medicines Agency [EMA], 2018), sendo que os compostos com maior volume de vendas, expressado em mg/PCU, pertenciam às tetraciclínas (32%), penicilinas (26%) e sulfonamidas (12%). No geral, estas três classes representaram 70% do total de vendas nos 30 países. Relativamente aos antimicrobianos classificados pela OMS como criticamente importantes para a medicina humana e considerados antimicrobianos de alta prioridade, as cefalosporinas de terceira e quarta geração, quinolonas, polimixinas (colistina) e macrólidos contabilizaram 0,2 %, 2,6 %, 5,1 % e 7,0 %, respetivamente, das vendas relativas a antibióticos utilizados em animais de produção (EMA, 2018; WHO, 2017).



A par com a tendência verificada em saúde humana também na saúde animal se verifica que o nível de consumo de antibióticos mais elevado ocorre nos países do sul da Europa, comparativamente com os países do norte da Europa (EMA, 2018).

Relativamente aos agentes antimicrobianos veterinários para administração a animais de companhia, foram apenas reportadas no relatório as vendas relativas a comprimidos, sendo que as vendas relativas às restantes formas farmacêuticas correspondiam apenas aos animais de produção. Do total de vendas realizadas em 2016 nos 30 países europeus as vendas de comprimidos representaram 0,9% e as vendas das restantes formas farmacêuticas 99,1%. Assim, a venda de comprimidos foi contabilizada como uma menor proporção do total de vendas dos agentes antimicrobianos veterinários em 2016, com exceção de alguns países do Norte da Europa, nomeadamente, Finlândia, Islândia, Luxemburgo, Noruega, Eslovénia, Suécia e o Reino Unido (EMA, 2018). No caso específico de Portugal, as percentagens eram semelhantes à média europeia, sendo que apenas 0,5% das vendas correspondia a comprimidos e os restantes 99,5% a outras formas farmacêuticas (EMA, 2018).

Na análise das vendas de substâncias ativas por forma farmacêutica, a maioria dos medicamentos foram comercializados para medicina das populações (90,1%), correspondendo na sua maioria a pré-misturas medicamentosas (40,8%), seguidas de soluções orais (37,4%) e pós para administração oral (11,9%). Dos medicamentos comercializados para medicina individual (9,9%), a vasta maioria correspondia a preparações injetáveis (9,0%), seguidas de preparação intramamárias (0,6%) e de pastas orais, bólus e preparações uterinas (0,3%) (EMA, 2017).

Em Portugal, 69,44% do total de vendas em 2014 era composto por apenas três classes de antimicrobianos (tetraciclina, penicilinas e macrólidos). As tetraciclina representaram cerca de 39% do total das vendas nesse ano, as penicilinas cerca de 18% e os macrólidos 12%. A oxitetraciclina, a amoxicilina, a tilosina e a doxiciclina foram as substâncias ativas mais vendidas (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2014). Dos dados disponíveis relativamente aos medicamentos veterinários vendidos para uma espécie-alvo, para as aves a substância ativa administrada mais frequentemente foi a enrofloxacina (5,764T), para bovinos o florfenicol (0,151T), para suínos a oxitetraciclina (30,510T), para coelhos a bacitracina (1,233T) e para cavalos a paramomicina (0,566T); para animais de companhia verificou-se que a substância ativa mais frequentemente administrada a cães foi a amoxicilina (0,183T) enquanto para os gatos foi a cefalexina (0,006T) (DGAV, 2014).

Por fim, como referido no oitavo relatório da ESVAC as variações de consumo de agentes antimicrobianos observadas entre países podem ser devidas a uma variedade de fatores, como por exemplo, os hábitos de prescrição do médico veterinário, a distribuição de espécies animais e sistemas de produção, a disponibilidade e valor económico de produtos antibacterianos veterinários no mercado, e ainda a ocorrência de doenças infecciosas em cada país.

## 1.2. Antibiorresistência em Medicina Humana

Em 1946, *Alexander Fleming* declarou que a penicilina só deveria ser usada nos casos em que um microrganismo é suscetível, pela via apropriada, numa dose adequada e por um período de tempo apropriado, aconselhando que os médicos não fossem influenciados pelos pacientes ou pelos *media*. Embora desde então muitos avanços tenham ocorrido na área da medicina, mais de 60 anos depois as suas recomendações ainda são válidas (Edwards & Gould, 2012).

Foi já demonstrado, que cerca de 30% da população hospitalar já recebeu algum tipo de tratamento antimicrobiano sem consideração pelo tipo de infecção específica a tratar (AMF, 2018; ECDC, 2017a). Além disso até 50% das prescrições antimicrobianas são inadequadas, seja em relação à indicação, via, dose, alergias conhecidas ou informação relativa à suscetibilidade dos microrganismos alvo. Este comportamento levou ao cenário catastrófico atual, no qual nos países desenvolvidos pessoas morrem com infecções resistentes a todo o tipo de antibióticos conhecidos (Edwards & Gould, 2012).

O aumento da resistência tem vindo a ser registado em todas as bactérias clinicamente importantes, incluindo a antimicrobianos classificados como "criticamente importantes" para a saúde humana (WHO, 2017), sendo que as taxas de resistência da maioria das espécies bacterianas são muito mais elevadas nos países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos (Zarb & Goossens, 2012). Além disso, têm sido apontadas inúmeras razões para explicar as diferenças no consumo de antibióticos entre os países europeus, destacando-se a incidência de infecções adquiridas na comunidade, os determinantes culturais e sociais, a organização das estruturas prestadoras de cuidados de saúde, os recursos humanos e financeiros disponíveis, o conhecimento acerca dos antibióticos, o mercado farmacêutico e as práticas de regulamentação existentes (Loureiro *et al.*, 2016).

Nos países em desenvolvimento, este problema é agravado pelo acesso escasso a laboratórios de diagnóstico adequados, pela falta de recursos para implementação de práticas adequadas de controlo de higiene e infecção e pelas dificuldades no acesso a cuidados médicos adequados e financeiramente acessíveis (Zarb & Goossens, 2012). Outro tipo de fator de risco associado ao uso inadequado de antibiótico é a automedicação, sendo reportado à escala global e com maior incidência em países em desenvolvimento (Zarb & Goossens, 2012).

Para colmatar o problema das resistências antimicrobianas foram desenvolvidos programas de prevenção e controlo de infeções e de resistências aos antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*) (Pulcini, Ergönül, Can & Beović, 2017). Estes programas são definidos como um esforço multidisciplinar que visa a redução da capacidade de resistência antimicrobiana apresentada pelos agentes patogénicos humanos através da diminuição do uso de antimicrobianos, sobretudo os de largo espectro, como forma de compensar os escassos avanços na área do desenvolvimento de novos antibióticos (Edwards & Gould, 2012).

De facto, estes programas pretendem contribuir para a manutenção da eficácia dos antibióticos disponíveis, ao mesmo tempo que tentam minimizar a emergência de estirpes resistentes (Prescott & Boerlin, 2016).

As estratégias destes programas incluem a otimização da seleção, do doseamento, da via de administração e da duração da terapêutica antimicrobiana de forma a maximizar a probabilidade de sucesso dos tratamentos clínicos ou de prevenção da infeção. (Pulcini & Gyssens, 2013).

Idealmente, um programa de controlo e prevenção de resistências a antimicrobianos deveria ser formado por uma equipa multidisciplinar de profissionais de saúde, incluindo um médico de doenças infecciosas, um farmacêutico clínico com formação na área das doenças infecciosas, um microbiologista e ainda um epidemiologista hospitalar (Edwards & Gould, 2012). Não obstante, é ainda essencial a formação contínua relativa ao uso prudente de antibióticos de todos os profissionais de saúde que possam contactar com pacientes a quem sejam prescritos antibióticos (enfermeiros, farmacêuticos), uma vez que estes devem receber informações coerentes relativamente à utilização correta e prudente de antibióticos anteriormente ao seu consumo (Pulcini *et al.*, 2017).

Devido à sua natureza multidisciplinar e uma vez que visam a implementação de várias estratégias em simultâneo, os programas de controlo de prevenção de resistências a antimicrobianos são difíceis de avaliar (Edwards & Gould, 2012); no entanto, as avaliações realizadas até à data demonstraram que estes programas têm sido eficazes na maior parte dos países onde são implementados (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2018; European Commission [EC], 2017; WHO, 2014)

Contudo, apesar de todos os esforços desenvolvidos, algumas espécies bacterianas patogénicas resistentes a determinados antibióticos de elevada importância clínica persistem no meio hospitalar e na comunidade. Entre as mais importantes destacam-se: *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas, *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de terceira geração e a carbapenemos e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (WHO, 2014). Neste contexto, as infeções por *E. coli* multirresistente continuam a ser frequentes a nível hospitalar, apresentando como principais fatores de risco a hospitalização prolongada, imunossupressão, realização de procedimentos invasivos como cateterização urinária ou venosa e tratamento com antimicrobianos de amplo espectro (Collignon, 2012a; Trott *et al.*, 2004).

Importa referir que muitos dos agentes antimicrobianos utilizados em humanos são igualmente utilizados em animais, sendo alguns desses agentes antimicrobianos essenciais para a prevenção ou tratamento de infeções potencialmente fatais nos humanos (WHO, 2017). Logo, para assegurar a continuidade da eficácia desses agentes antimicrobianos e minimizar o desenvolvimento de resistência, a medicina humana deve trabalhar conjuntamente com a medicina veterinária numa perspetiva “Uma só Saúde”.

### 1.3. Antibiorresistência em Medicina Veterinária

Os agentes antimicrobianos são cruciais para os cuidados médicos e para a saúde dos animais, porém a pressão seletiva exercida pela sua utilização extensiva não pode deixar de ser referida como uma das principais razões do aparecimento e disseminação de determinantes de multirresistência entre bactérias patogénicas e comensais tanto em medicina humana como em medicina veterinária (Brown & Wright, 2016; Center for Disease Dynamics, Economics and Policy (CDDEP), 2016; Collineau *et al.*, 2017; Loureiro *et al.*, 2016; Tadesse *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2017; Van Boeckel *et al.*, 2015, 2017). O risco aumenta se esses agentes antimicrobianos forem utilizados de forma inadequada, por exemplo de uma forma não especificamente direcionada (como medicação em massa ou utilização em microrganismos não suscetíveis), em doses subterapêuticas, de forma reiterada ou durante períodos de tempo inadequados (UE, 2015).

O controlo de infeções em medicina veterinária tornou-se especialmente problemático devido ao aparecimento de estirpes multirresistentes tanto em animais de produção como em animais de companhia (Sanchez *et al.*, 2002).

Embora recentemente tenha havido um aumento de publicações referentes à presença de bactérias resistentes e zoonóticas nos animais de companhia (Currie *et al.*, 2018; Prescott & Boerlin, 2016), as investigações na área têm sido centradas, principalmente em populações humanas e em animais de produção (Jackson, Davis, Frye, Barrett & Hiott, 2015; Murphy *et al.*, 2009; Wooldridge, 2012).

Segundo o estudo de Sayah *et al.* (2005) os níveis mais elevados de resistências foram obtidos de isolados de animais de produção (bovinos, suínos, aves, pequenos ruminantes), seguidos dos isolados de animais de companhia e equinos. Animais selvagens que não são intencionalmente expostos a grandes quantidades de agentes antimicrobianos, exibiram uma prevalência significativamente menor de resistência a estes compostos, o que é consistente com a hipótese de que a exposição da microbiota intestinal comensal aos agentes antimicrobianos seleciona as estirpes bacterianas resistentes (Sayah *et al.*, 2005). É ainda importante referir que mais de 21% de todos os isolados de *E. coli* do referido estudo exibiram um perfil de resistência a mais de um agente.

Num estudo realizado nos EUA, Davis *et al.* (2011) relataram o isolamento de *E. coli* resistente a antimicrobianos comumente usados em medicina humana a partir de cães e gatos saudáveis, o que provavelmente se deve ao facto de os antimicrobianos usados em medicina veterinária pertencerem essencialmente às mesmas classes de antimicrobianos usados em seres humano.

Apesar das fortes evidências de que o uso de antimicrobianos em animais pode promover o desenvolvimento de resistência em alguns agentes patogénicos zoonóticos, os dados estão longe de ser conclusivos e o impacto relativo do uso de antimicrobianos em várias espécies animais sobre a resistência antimicrobiana em agentes patogénicos humanos tem sido

quantificado de forma inadequada (Tang et al., 2017; Weese et al., 2015). De facto, apesar de alguns antibióticos serem utilizados no tratamento de infeções bacterianas tanto em animais como em humanos, a disseminação de estirpes resistentes em humanos tem origem maioritariamente em falhas na administração incorreta de antibióticos a humanos (Guardabassi, 2013; Philips *et al.* 2004 citado por Weese *et al.*, 2015).

É ainda importante referir que tem havido um interesse crescente na avaliação da presença de bactérias resistentes em animais selvagens e no meio ambiente. De facto, estirpes resistentes foram já detetadas numa grande variedade de espécies selvagens, que têm sido indicadas como potencial reservatório de bactérias resistentes e genes de resistência, apesar de tal correlação não ser esperada e a sua origem não ser clara (Allen *et al.*, 2011).

### 1.3.1. Animais de Produção

Os tratamentos terapêuticos são destinados a animais doentes. Relativamente aos animais de produção, estes podem ser tratados individualmente, mas muitas vezes é mais eficiente realizar uma terapêutica de grupo introduzindo os medicamentos nos alimentos (alimento medicamentoso) ou água (União Europeia [UE], 2015). Para alguns animais, como aves e peixes, a medicina das populações é o único método de tratamento viável. Neste caso, os tratamentos metafiláticos, visam a administração do medicamento em simultâneo a um grupo de animais clinicamente saudáveis (mas provavelmente infetados) que tenham estado em contacto com a doença, a fim de evitar que desenvolvam sinais clínicos e prevenir a propagação da doença. Já os tratamentos antimicrobianos profiláticos são tipicamente utilizados durante períodos de alto risco para doenças infecciosas (por exemplo, após o desmame ou o transporte) (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

Em suínos os agentes antimicrobianos são mais frequentemente utilizados para aliviar a diarreia na fase de desmame, infeções intestinais associadas à *Lawsonia intracellularis* e doenças respiratórias, muitas vezes relacionadas com o transporte e a tensão causada quando os suínos provenientes de explorações diferentes são agrupados ou quando os animais são mantidos em instalações com sistemas de ventilação inapropriados, métodos de alimentação inadequados e/ou medidas de biossegurança insuficientes (UE, 2015).

Em aves a medicação em grupo profilática é frequentemente realizada imediatamente antes ou após o transporte de pintos do dia ou, em certos casos, para fazer face a perdas de produtividade (UE, 2015).

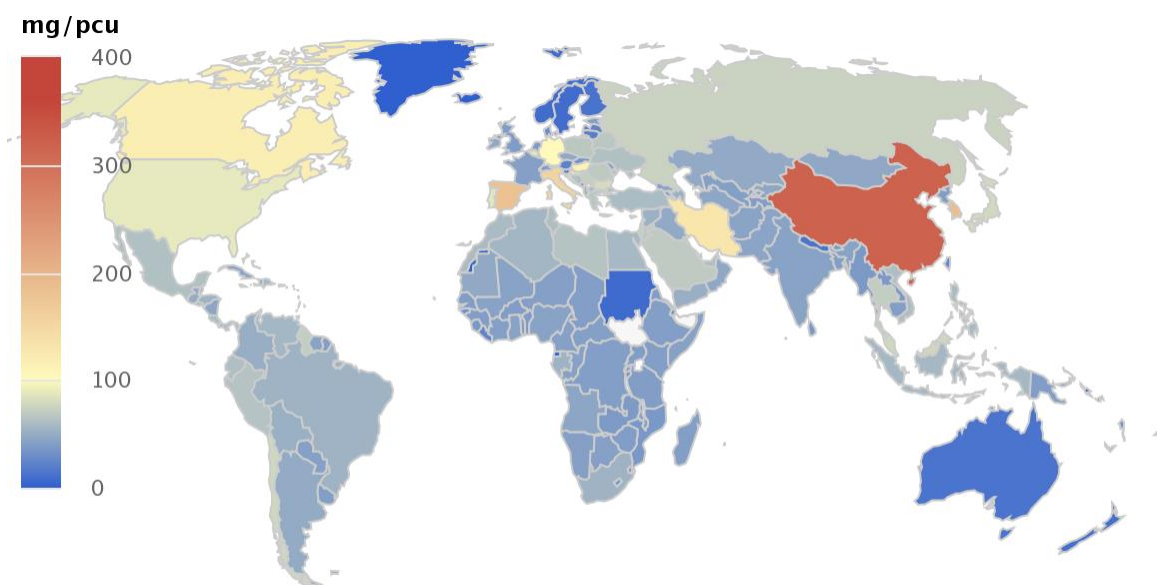
A medicação em massa ou em grupo de bovinos é rara, embora os vitelos de engorda possam ser alvo de tratamento em grupo com recurso a agentes antimicrobianos. O tratamento antimicrobiano dado às vacas em períodos de secagem reveste-se de especial importância (UE, 2015).

As duas principais indicações terapêuticas que exigem medicação em grupo nos coelhos são a diarreia de desmame e os problemas respiratórios (UE, 2015).

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento, incluindo a bacitracina, o glicopéptido avoparcina, os macrólidos espiramicina e tilosina e a estreptogramina virginiamicina, foram gradualmente retirados do mercado da União Europeia (UE) entre 1995 e 1999, com base no "Princípio da Precaução". Em alguns países, os antimicrobianos ainda são administrados na pecuária como promotores de crescimento, mas na Europa não são usados com esta finalidade desde 2006 (Zarb & Goossens, 2012).

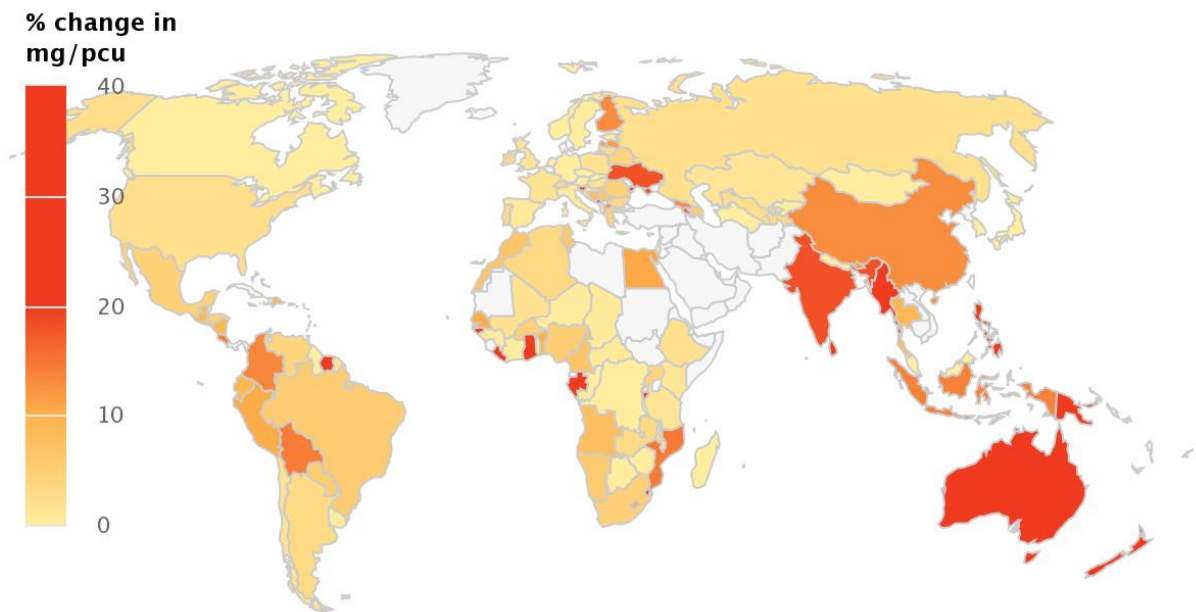
Os antimicrobianos são amplamente utilizados na produção pecuária para manter a saúde, contribuindo para a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos tanto em medicina veterinária como em medicina humana. O centro para o estudo da dinâmica, economia e política da doença (*Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*, [CDDEP]) desenvolveu o primeiro mapa global do consumo de antibióticos em animais de produção (*Van Boeckel et al.*, 2015) e estimou que em 2010 foram consumidas 63,151 toneladas. Essas estimativas foram recentemente atualizadas e estima-se que em 2013 (figura 2), 131,109 toneladas de antimicrobianos foram consumidas globalmente por animais de produção (*Van Boeckel et al.*, 2017). De acordo com estas estimativas, a China, os Estados Unidos, o Brasil e a Índia continuam a ser os maiores consumidores de antibióticos nesta área, sendo responsáveis pelo consumo de três quartos do total global. Com base nas projeções atuais, o CDDEP estimou que o consumo total de antibióticos pelos animais de produção aumentaria em 52% até 2030 (figura 3). Os principais impulsionadores serão o crescimento da procura do consumidor por carne e outros produtos de origem pecuária em países em desenvolvimento e a consequente mudança para sistemas de produção intensivos onde os antimicrobianos são usados rotineiramente. Estimativas e projeções recentes para cada país em 2013 e até 2030 podem ser consultadas nas figuras 2 e 3, respectivamente.

Figura 2. Consumo de Antibióticos pelos animais de produção. Estimativa para 2013. Adaptado de *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy* (2015)



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org) © Natural Earth

Figura 3. Mudança de padrão de consumo de antibióticos em animais de produção (%). Estimativa para 2030. Adaptado de *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy* (2015)



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org) © Natural Earth



### 1.3.2. Animais de Companhia

Nos últimos anos, o interesse pela temática da resistência antimicrobiana em animais de companhia têm vindo a aumentar, o que se deve em parte ao número crescente de notificações de animais de companhia infetados ou colonizados com microrganismos resistentes a múltiplos fármacos clinicamente e epidemiologicamente importantes (Moodley *et al.*, 2006, Vengust *et al.*, 2006, citados por Murphy *et al.*, 2009). Nos animais de companhia este fenómeno é muitas vezes relacionado com a utilização excessiva de antimicrobianos no tratamento de infeções nesses animais (Belas, Salazar, Gama, Couto, & Pomba, 2014; Schwarz, Loeffler, & Kadlec, 2017), ainda que por vezes os pacientes são tratados com antibióticos de amplo espectro sem a certeza da sua real necessidade, já que muitas vezes não são realizados exames complementares que permitam a identificação bacteriana e a sua suscetibilidade antimicrobiana (Ishii, Freitas, & Arias, 2011).

Estudos relativos à utilização de antibacterianos em hospitais escolares veterinários confirmam que esta prática é comum, sendo que 3/4 dos antibióticos prescritos/ administrados são  $\beta$ -lactâmicos de amplo espetro, em particular a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, que ainda é o antibiótico prescrito com maior frequência em muitos países (BSAVA, 2017). Esta utilização disseminada de antimicrobianos de amplo espectro pode indicar um grau de incerteza no diagnóstico exato da condição clínica a tratar. Um estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA), em 2011, permitiu constatar que 32% das prescrições antibacterianas foram realizadas com fins não terapêuticos, incluindo fármacos utilizados para tratar pacientes imunocomprometidos sem infeção documentada, para profilaxia cirúrgica e ainda a administração de metronidazol a pacientes com diarreia ou *shunts* portossistémicos. Embora este número possa estar relacionado com a casuística particular de um hospital de ensino veterinário, é interessante notar que mesmo em uso terapêutico, apenas 17% foram realizadas para infeções confirmadas e 45% para suspeitas de infeção, enquanto para 38% dos casos não tinham sido documentadas evidências de infeção. Os investigadores concluíram que, embora os clínicos tenham acesso a uma variedade de ferramentas de diagnóstico que permitam decidir qual a melhor antibioterapia, é provável que haja um uso excessivo ou inadequado de antibacterianos na prática veterinária (Belmar-Liberato, Gonzalez-Canga, Tamame-Martin, & Escibano-Salazar, 2011; Mateus *et al.*, 2011; Radford *et al.* 2011; Wayne *et. al.*, 2011 citado em BSAVA, 2017).

Empiricamente, seria expetável que a frequência de determinantes de resistência em isolados bacterianos provenientes de cães fosse menor do que em isolados de humanos, uma vez que a frequência de exposição a estes compostos é menor, bem como a frequência de hospitalização. Além disso, os animais doentes crónicos são frequentemente submetidos à eutanásia e animais imunocomprometidos não são tratados com compostos antimicrobianos de amplo espectro, como o Imipenem (Prescott, Hanna, Reid-Smith, & Drost, 2002).

As espécies bacterianas presentes nos animais encontram-se frequentemente bem adaptadas aos seus hospedeiros. No entanto, há evidências descritas que referem a transferência de espécies resistentes de animais para humanos e vice-versa (Ljungquist *et al.*, 2016; Pomba *et al.*, 2016; Rocha-Gracia *et al.*, 2015). Por exemplo, encontram-se descritas a transferência de *Staphylococcus pseudointermedius* (*S. pseudointermedius*) de cães para humanos e a transferência indireta de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) de um cão para um paciente numa unidade de cuidados intensivos. No entanto, este fenómeno pode ocorrer nos dois sentidos, uma vez que uma estirpe de MRSA proveniente de humanos pode ter sido responsável por um surto em cavalos num hospital de ensino veterinário, existindo também evidências de que gatos podem ser colonizados por *S. aureus* de origem humana (Prescott *et al.*, 2002).

#### 1.4. Determinantes de antibiorresistência

Os determinantes de resistência bacteriana podem ser transferidos por mecanismos diversos, entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, incluindo da microbiota animal para humana e vice-versa (Mota *et al.*, 2005).

Existem diversos mecanismos, segundo os quais as bactérias conseguem desenvolver resistências aos antibióticos. A resistência antimicrobiana pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ou natural é inerente à vasta maioria das estirpes da espécie, fazendo parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo (Sayah *et al.*, 2005). Este tipo de resistência é transmitida verticalmente de geração em geração, uma vez que faz parte da herança genética do microrganismo (Sá, Fiol, & Groppo, 2000). O principal determinante responsável pela resistência intrínseca dos microrganismos é a ausência do alvo para a ação do fármaco. Este tipo de resistência não apresenta qualquer risco ao sucesso da terapêutica, pois é previsível, bastando conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis clinicamente, para evitar a administração de antimicrobianos aos quais as estirpes envolvidas seriam intrinsecamente resistentes (Gold & Moellering, 1996; Sá *et al.*, 2000).

A resistência não natural ou adquirida ocorre quando uma estirpe bacteriana anteriormente sensível a um fármaco se torna resistente. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extra cromossômicas (plasmídeos) (Gold & Moellering, 1996; Mukerji *et al.*, 2017). Uma simples alteração genética pode levar ao aparecimento de uma estirpe resistente, que normalmente mantém a viabilidade e potencial patogénico. Assim, a resistência adquirida envolve uma mudança na composição genética do microrganismo devido à ocorrência de mutações no ADN (ácido desoxirribonucleico) cromossômico ou da aquisição de ADN exógeno (Mandigan *et al.*, 2012, citado por Silva, Knobl, & Moreno, 2013). As bactérias adquirem genes de resistência a agentes antimicrobianos através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposões e integrões, através de mecanismos de conjugação, transdução e transformação (Acar & Moulin, 2012; Mukerji *et al.*, 2017). A integração destes elementos móveis no ADN bacteriano pode também resultar em mutações em genes responsáveis pela captação ou ligação de agentes antimicrobianos ou pela ativação de genes silenciosos (Acar *et al.*, 2012).

Os principais mecanismos gerais de resistência adquirida, todos controlados pela ação de genes específicos, incluem o efluxo ativo, que promove a expulsão do antibiótico da célula bacteriana, impedindo-o de atingir seu alvo; a redução da permeabilidade da parede ou da membrana celular da bactéria, que ocorre quando a composição do envelope bacteriano é modificada; a inativação do antibiótico por enzimas, que podem promover alterações nas moléculas do antibiótico dentro da célula bacteriana ou fora dela; e a alteração dos recetores-

alvo do antibiótico, reduzindo a afinidade da célula bacteriana para o antibiótico (Acar & Moulin, 2012; Barie, 2012; Mukerji *et al.*, 2017).

Recentemente têm sido desenvolvidos estudos focados na investigação dos mecanismos de transferência dos elementos genéticos de resistência entre bactérias, e as vias de risco de propagação de estirpes resistentes (Wooldridge, 2012).

Sabe-se que os genes relacionados com resistências a antibióticos provêm de ambientes naturais; no entanto, as atividades humanas que se desenvolvem nestes ambientes levam a uma amplificação significativa desses genes originais que se disseminam até em ambientes clínicos humanos. Desta maneira, os antibióticos são libertados para o ambiente durante as atividades antropogénicas, sendo os humanos e os animais recetores e disseminadores intermediários, contribuindo significativamente para a circulação de bactérias resistentes (Hu *et al.*, 2017; Wooldridge, 2012).

Os animais de produção, por exemplo, produzem milhões de toneladas de matéria fecal que são frequentemente distribuídas como fertilizante em pastagens, podendo atingir águas subterrâneas, ribeiros e outras águas fluviais e promover a disseminação de bactérias portadoras de determinantes de resistência antimicrobiana para estes ambientes (Wooldridge, 2012). Porém, a produção animal não é de forma alguma o único fator responsável por este problema. Efluentes de origem humana provenientes de residências, zonas comerciais e, especialmente, de hospitais, também atingem frequentemente rios e Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARS) municipais. De facto, já foram detetados compostos farmacêuticos, em níveis baixos na maioria dos cursos de água da Europa, o que pode afetar os padrões de resistência das bactérias presentes nestes ambientes (Ashbolt *et al.*, 2013; McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Para além dos ambientes aquáticos poderem atuar como veículo de transmissão de bactérias resistentes, estas podem ainda ser transmitidas diretamente entre diferentes espécies animais incluindo humanos, através do contato com animais infetados e animais selvagens, roedores e animais erráticos que funcionam como vetores (Vaarten, 2012).

Atualmente existem evidências consideráveis de que uma via provável de disseminação de resistência antimicrobiana é a cadeia alimentar, permitindo a transmissão direta de determinantes de resistência dos animais de produção para os humanos (McEwen, 2012; Wooldridge, 2012). É ainda importante referir que os fómites (roupas ou outros objetos) contaminados com bactérias resistentes a antibióticos podem ser responsáveis pela transmissão indireta deste tipo de microrganismos (Wooldridge, 2012).

Nas espécies bacterianas presentes em humanos e animais domésticos, a RAM desenvolve-se principalmente como consequência da exposição a antimicrobianos (Schwarz *et al.*, 2017; Ventola, 2015; WHO, 2017). A colonização ou infeção por uma estirpe bacteriana resistente pode ocorrer por transferência direta de bactérias resistentes, após transferência horizontal

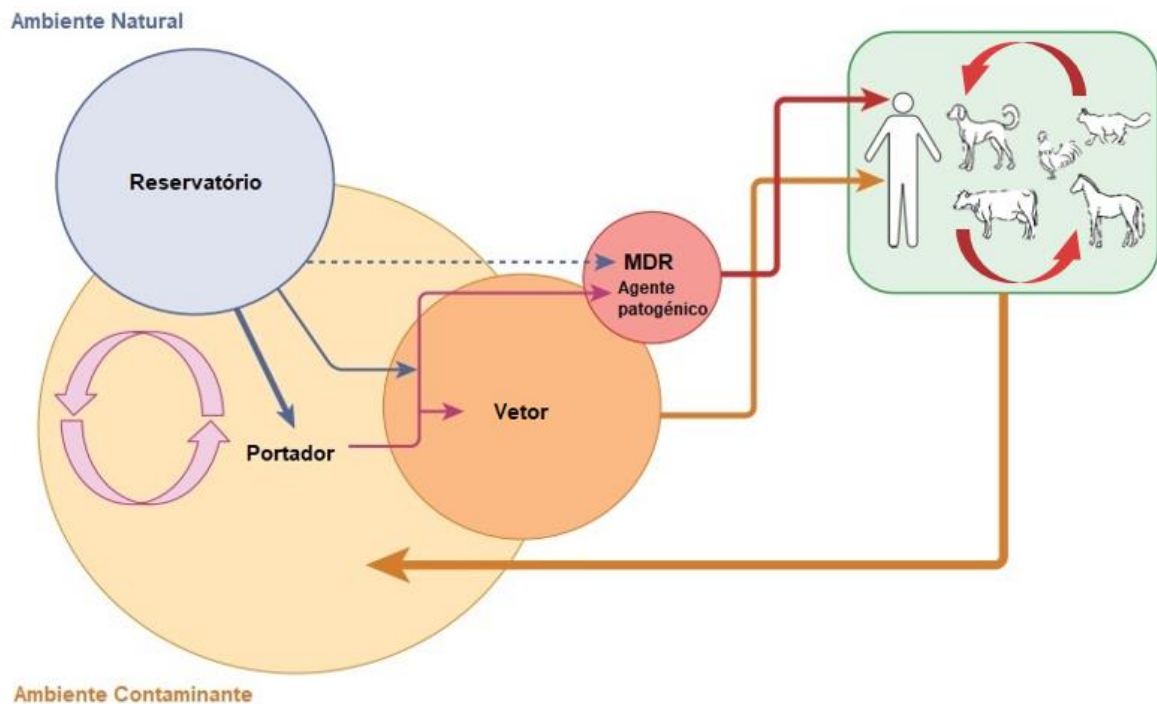
de genes de resistência após contato direto com bactérias resistentes ou através do consumo de alimentos e água contaminados (Allen *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2017).

O estudo da transferência de determinantes de antibiorresistência é uma área bastante complexa e ainda dificultada por importantes lacunas de dados, embora seja inegável que o uso de antimicrobianos seja uma das principais causas responsável pelo aparecimento de resistências adquiridas aos antimicrobianos.

Resumidamente, tal como se pode observar na figura 4, as resistências bacterianas podem ter origem no meio ambiente natural (*pool* genético antibiorresistente natural) ou podem resultar das atividades humanas, originando um meio ambiente contaminante. Os genes de resistência presentes em ambos os ambientes constituem o resistoma ambiental (Manaia, 2017). A maior parte das bactérias antibiorresistentes de origem ambiental natural que detêm genes de resistência capazes de ser transferidos, direta ou indiretamente, para bactérias clinicamente relevantes são consideradas reservatórios (Manaia, 2017). No meio ambiente contaminante existem bactérias resistentes a antibióticos capazes de disseminar genes de resistência no ambiente mas que não possuem a capacidade de colonizar ou infectar animais (portadores), e bactérias resistentes a antibióticos capazes de colonizar e invadir animais (vetores). Desta forma, as bactérias portadoras têm uma elevada capacidade para a aquisição e transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos com grande relevância clínica, enquanto os vetores incluem bactérias comensais e bactérias com elevada relevância clínica com elevada capacidade de adquirir genes de resistência. Logo, apesar da sua incapacidade de colonização, a disseminação e proliferação de bactérias portadoras no meio ambiente contaminante aumenta a abundância e diversidade de genes de resistência nos vetores (Manaia, 2017; Mukerji *et al.*, 2017).

Para além disto a capacidade de resistência pode ser transmitida bidirecionalmente entre animais e humanos via plasmídeos ou através de recombinação genética (transposições e integrões) (Mukerji *et al.*, 2017; Weese *et al.*, 2015). De facto, os plasmídeos representam mecanismos de mobilização de genes de resistência com um papel importante na disseminação da resistência entre bactérias de animais de companhia (Jackson *et al.*, 2015).

Figura 4. Relação entre o resistoma do meio ambiente natural e do meio ambiente contaminante e potenciais vias de transferência de bactéria MDR (multirresistente). Reservatório: Bactérias do meio ambiente natural que detêm genes resistentes a antibióticos que podem ser transferidos a bactérias clinicamente relevantes. Portador: Maioritariamente bactérias do ambiente contaminante com elevada capacidade de aquisição e transferência horizontal de genes de resistência. Vetor: Bactérias comensais e bactérias de relevância clínica presentes em animais, com elevada capacidade de aquisição de genes de resistência a antibióticos por transferência horizontal. Agente patogênico MDR: agentes com elevada capacidade de infecção e de causar doença. Adaptado de Manaia (2017) e Mukerji (2017).



### **1.5. Fatores de risco associados a antibiorresistência em isolados de animais de companhia**

Foram já identificados vários fatores de risco como estando associados à presença de bactérias resistentes em isolados provenientes de animais de companhia. A exposição a agentes antimicrobianos tem sido descrita como o principal fator de risco para o desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana, sendo o mais amplamente estudado (Cantón & Morosini, 2011; DGAV, 2014; Wedley *et al.*, 2017).

A coabitação também foi identificada como um fator de risco num estudo de Han, Yang & Park (2016). Neste trabalho os autores referem que a presença de animais coabitantes pode aumentar o risco da presença de microrganismos patogénicos, mais especificamente, de *Staphylococci* resistentes à metilina, em cães.

O contato com humanos também constitui um fator de risco. Apesar de raros foram já descritos alguns casos de transmissão de resistências antimicrobianas, a grande maioria casos de MRSA e *Escherichia coli*, do ser humano para o seu animal, (Cole & Rankin, n.d.; Johnson, Owens, Gajewski, & Clabots, 2008). Em 2004, um estudo holandês reportou o isolamento de uma estirpe de MRSA isolada a partir do nariz de um cão saudável, cuja tutora tinha sido infetada por MRSA enquanto trabalhava numa casa de repouso. Os autores demonstraram que ambas as estirpes de MRSA eram idênticas, ou seja, o contato com tutores com profissões relacionadas com a área da saúde e neste caso portadores de MRSA aumenta também a probabilidade de isolamento de bactérias resistentes em cães (Van Duijkeren *et al.*, 2004).

Outro caso semelhante foi reportado em 2009, nos EUA, no qual um cão saudável foi infetado pelo tutor que contactava frequentemente com o sistema hospitalar devido a doença crónica. Dado o perfil de resistência aos medicamentos antimicrobianos apresentados pelos isolados de MRSA e o contato constante e próximo do tutor com o sistema de saúde, os investigadores suspeitaram que a fonte da infeção por MRSA fosse o meio hospitalar. Provavelmente o animal adquiriu MRSA através do contato próximo com o seu tutor, sendo que neste caso a hipótese de transmissão entre humanos e cães foi também apoiada pela associação temporal de ambas as infeções, sendo que o resultado das culturas bacterianas demonstraram que a infeção do tutor era prévia à infeção do animal (Rutland, Weese, Bolin, Au, & Malani, 2009).

Também com base em estudos epidemiológicos, em 2009, foram reportados mais dois casos de transmissão de MRSA de humanos para os seus cães (Nienhoff *et al.*, 2009). No primeiro caso, o tutor era médico veterinário de uma exploração de suínos, tendo sido provado que a transmissão de MRSA ocorreu no sentido suíno-veterinário-cão. No segundo caso, a tutora recebia cuidados continuados na sua habitação, devido à presença de uma úlcera por decúbito na extremidade podal, sendo seguida por enfermeiras. O cão mantinha contato com as enfermeiras, sendo que foi provado que a transmissão de MRSA ocorreu no sentido tutor-

enfermeiras-cão. Em ambos os casos tanto o tutor como o animal partilhavam as mesmas estirpes de MRSA (Nienhoff *et al.*, 2009)

Um estudo mais recente demonstrou mais uma vez a capacidade de adaptação de isolados humanos a animais, revelando a ocorrência de disseminação de mecanismos de resistência contra a tigeciclina, uma das últimas opções terapêuticas para infeções complicadas em humanos (Ovejero *et al.*, 2017).

Num estudo realizado com humanos e cães Stenske *et al.* (2009) concluíram que os tutores e o grupo controlo de humanos (sem exposição diária a animais) tinham maior probabilidade de serem portadores de bactérias multirresistentes a antimicrobianos do que os cães incluídos no estudo. Outra conclusão importante deste estudo é o facto de a partilha de *E. coli* ter-se revelado mais comum entre espécies que partilhavam também a mesma casa do que entre aquelas que não partilhavam a mesma casa. Neste estudo foi ainda descrito que cães que bebiam água da sanita tinham maior probabilidade de ser portadores de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas do que cães que não o faziam.

Um dos grandes desafios para a medicina veterinária e cirurgia de animais de companhia é o controlo de infeções nosocomiais multirresistentes, constituindo este um dos fatores de risco associados à transmissão de antibiorresistência (Prescott *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2002; Trott *et al.*, 2004). Um estudo realizado nos EUA demonstrou que bactérias oportunistas multirresistentes pertencentes à espécie de *E. coli* tornaram-se endémicas no ambiente hospitalar veterinário, tendo sido possível obter isolados de *E. coli* resistentes a 12 antibióticos a partir de dois cães internados na unidade de cuidados intensivos do Hospital Escolar da Universidade da Geórgia, EUA (Sanchez *et al.*, 2002).

Estudos mais recentes demonstraram que cães hospitalizados, frequentadores do ambiente hospitalar veterinário podem ser portadores de isolados de *E. coli* multirresistentes a vários antibióticos de elevada importância clínica (Tuerena, Williams, Nuttall, & Pinchbeck, 2016; Wedley *et al.*, 2017).

Em hospitais humanos, o estabelecimento de medidas de controlo de infeção e de diretrizes rigorosas de prescrição de antimicrobianos é útil para limitar a colonização de pacientes com estirpes resistentes a fármacos (*antimicrobial stewardship*) (Currie *et al.*, 2018; Edwards & Gould, 2012; Prescott & Boerlin, 2016). No entanto, essas medidas podem não alcançar a mesma taxa de sucesso nos hospitais veterinários devido à maior oportunidade de transmissão oro-fecal entre animais (Trott *et al.*, 2004). Além disso, a ocorrência de feridas oportunistas ou infeções pós-cirúrgicas são muito comuns em animais de companhia devido à reduzida *compliance* do tutor, o que faz com que os médicos veterinários sejam mais propensos a prescrever antimicrobianos profiláticos de amplo espectro (Trott *et al.*, 2004).



O tipo de alimentação dos animais também constitui um fator de risco importante na disseminação de bactérias resistentes.

Estudos anteriores realizados na Universidade de Liverpool investigaram a presença de bactérias resistentes a antibióticos em fezes de cães, e demonstraram que a inclusão de carne crua na dieta dos cães constituiu um fator de risco associado à transmissão de *E. coli* resistente a antibióticos importantes para o tratamento de infecções em humanos e cães (Schmidt & Williams, 2016; Wedley *et al.*, 2017).

## **2. *Escherichia coli***

### **2.1. Modelo bacteriano para estudos de antibiorresistência**

As bactérias fecais comensais indicadoras, como *E. coli*, são úteis para o estudo da resistência antimicrobiana tanto em medicina humana como em medicina veterinária, uma vez que 1) fazem parte da microbiota entérica comensal; 2) podem ser agentes patogénicos oportunistas e causar doença; 3) podem atuar como indicadores de pressão eletiva por antimicrobianos; e 4) podem constituir um reservatório de genes de resistência antimicrobiana e transmiti-los para outras espécies patogénicas ou zoonóticas (Jackson *et al.*, 2015; Mukerji *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2015). De facto, esta espécie bacteriana é usada como sentinela para monitorizar a presença de determinantes de antibiorresistências em bactérias de origem fecal, uma vez que é encontrada com bastante frequência numa ampla gama de hospedeiros e adquire facilmente resistência (Tadesse *et al.*, 2012).

As estirpes de *E. coli* comensais multirresistentes isoladas a partir de animais de companhia saudáveis podem possuir genes que conferem resistência a classes de antimicrobianos frequentemente usados em medicina humana e animal. A presença de genes de resistência neste grupo de bactérias pode limitar o número de medicamentos úteis para o tratamento de infeções causadas relacionadas (Jackson *et al.*, 2015).

Em medicina humana entre as infeções mais importantes causadas por *E. coli* encontram-se as pneumonias nosocomiais, as gastroenterites, as septicémias, as meningites neonatais e as infeções do trato urinário. Em medicina veterinária, em animais jovens, entre as infeções mais frequentemente relacionadas com *E. coli* encontram-se a colibacilose entérica (porcos), a diarreia neonatal e a septicémia ou toxémia. Em animais adultos as infeções urinárias (canídeos), as mastites (bovinos) e as endometrites (equinos) destacam-se como as mais frequentes (Mukerji *et al.*, 2017).

Assim, um estudo epidemiológico abrangente sobre a prevalência de espécies antibiorresistentes em animais deve incidir em três grupos de microrganismos: microrganismos veterinários, microrganismos zoonóticos e bactérias comensais indicadoras, como *E. coli*. Este tipo de estudo revela especial importância para a área da Saúde Pública (Caprioli *et al.*, 2000 citado por Murphy *et al.*, 2009).

## 2.2. Antibióticos relacionados com resistência em *Escherichia coli*

Dados de vigilância epidemiológica mostram que as estirpes de *E. coli* apresentam resistências consideravelmente elevadas para agentes antimicrobianos que se utilizam há muito tempo em medicina humana e veterinária. Nas últimas duas décadas observou-se um aumento no aparecimento e disseminação de bactérias multirresistentes e no aumento da resistência a compostos mais recentes, como fluoroquinolonas e certas cefalosporinas. A frequência de perfis de multirresistência em *E. coli* aumentou de 7,2% durante os anos 50, para 63,6% durante os anos 2000 (Tadesse *et al.*, 2012).

Deste modo, o controlo de infeções causadas por *Escherichia coli* em medicina veterinária tornou-se especialmente problemático devido ao aparecimento de estirpes resistentes em animais de produção e animais de companhia (Sanchez *et al.*, 2002). Resistência a aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim foram já descritos em isolados de *E. coli* obtidos a partir de animais de companhia, principalmente a partir de amostras clínicas (Jackson *et al.*, 2015).

Em 2016, na União Europeia/Espaço Económico Europeu (EU/EEE) mais de metade (58,6%) dos isolados de *E. coli* comunicados à *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-net) eram resistentes a pelo menos um dos grupos de antimicrobianos sob vigilância regular (aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos) (gráfico 1). Nessa data, a percentagem média mais elevada de resistência ponderada pela população da UE/EEE encontrava-se associada às aminopenicilinas (57,4%), seguida pelas fluoroquinolonas (21,0%), cefalosporinas de terceira geração (12,4%) e aminoglicosídeos (9,8%) (tabela 3). A resistência aos carbapenemos era rara (<0,1%) e a resistência à colistina era relatada esporadicamente (ECDCl, 2017b).

Carbapenemos intravenosos, como o imipenem, ainda podem ser usados geralmente para tratar a maioria das infeções para os quais são indicados, porém a resistência bacteriana a estes compostos de última linha tem vindo a aumentar rapidamente (Collignon, 2012b; Grönthal *et al.*, 2018).

As bactérias que expressam genes que codificam para  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL, *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases*) também são resistentes a muitos fármacos  $\beta$ -lactâmicos, sendo frequentemente resistentes a fármacos clinicamente importantes. Em animais de companhia, a espécie bacteriana mais frequentemente associada à produção de ESBL é a *E. coli*, sendo que estas estirpes podem estar presentes no trato gastrointestinal destes animais. Além disso, *E. coli* ESBL são agentes frequentes de infeções do trato urinário em cães e também podem causar infeções da pele e dos tecidos moles, bem como pneumonia (Ahmed, Price, & Graham, 2015; Cole & Rankin, n.d.; Saputra *et al.*, 2017).

Gráfico 1. *Escherichia coli*. Distribuição de isolados totalmente suscetíveis e de isolados resistentes a um, dois, três, quatro e cinco grupos antimicrobianos (incluindo aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos). Países EU/EEE. Adaptado de *Annual report of the EARS Network European, Centre for Disease Prevention and Control, 2017*

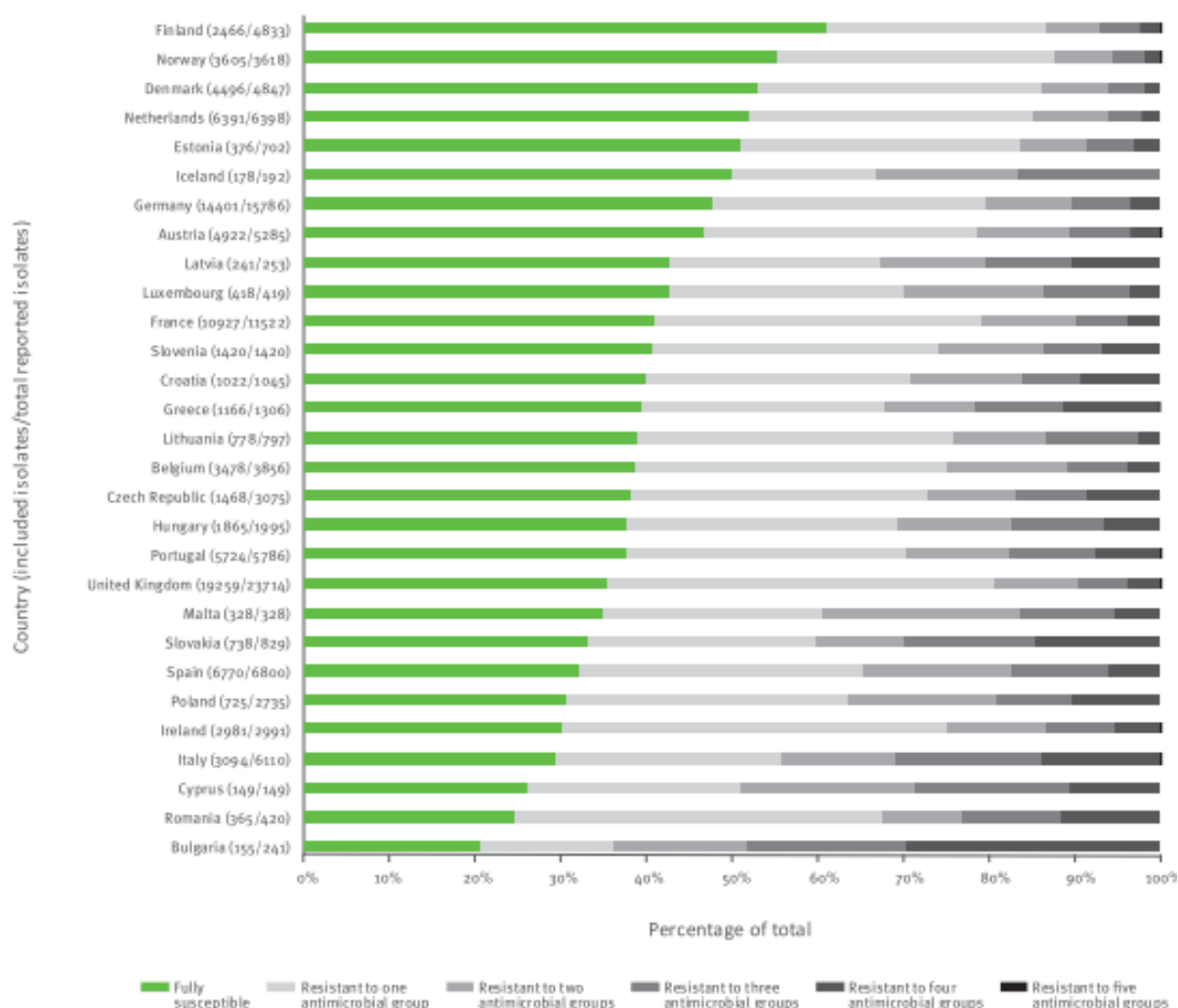


Tabela 3. *Escherichia coli*. Número total de isolados invasivos testados e combinações de resistência contra aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos. Países EU/EEE. Adaptado de *Annual report of the EARS Network European, Centre for Disease Prevention and Control*, 2017.

Padrão de resistência	Número de isolados	% do total
<b>Totalmente suscetível</b>	<b>41330</b>	<b>41,4</b>
<b>Resistência única (a um grupo antimicrobiano)</b>		
<b>Total (todas as resistências únicas)</b>	<b>35468</b>	<b>35,6</b>
Aminopenicilinas	33034	33,1
Fluoroquinolonas	2238	2,2
Outros grupos antimicrobianos	196	0,2
<b>Resistência a dois grupos antimicrobianos</b>		
<b>Total (todas as combinações de dois grupos)</b>	<b>10873</b>	<b>10,9</b>
Aminopenicilinas + Fluoroquinolonas	6830	6,8
Aminopenicilinas + Cefalosporinas de terceira geração	2242	2,2
Aminopenicilinas + Aminoglicosídeos	1659	1,7
Outras combinações de grupos antimicrobianos	142	0,1
<b>Resistência a três grupos de antimicrobianos</b>		
<b>Total (todas as combinações de três grupos)</b>	<b>7284</b>	<b>7,3</b>
Aminopenicilinas + Cefalosporinas de terceira geração + Fluoroquinolonas	4309	4,3
Aminopenicilinas + Fluoroquinolonas + Aminoglicosídeos	2513	2,5
Outras combinações de grupos antimicrobianos	462	0,5
<b>Resistência a quatro grupos de antimicrobianos</b>		
<b>Total (todas as combinações de quatro grupos)</b>	<b>4768</b>	<b>4,8</b>
Aminopenicilinas + Cefalosporinas de terceira geração + Fluoroquinolonas + Aminoglicosídeos	4758	4,8
Outras combinações de grupos antimicrobianos	10	<0,1
<b>Resistência a cinco grupos de antimicrobianos</b>		
Aminopenicilinas + Cefalosporinas de terceira geração + Fluoroquinolonas + Aminoglicosídeos + carbapenemos	11	<0,1

### **3. Objetivos do estudo**

Considerando a relevância da disseminação de bactérias multirresistentes para a Saúde Pública, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a hipótese de que animais de companhia, mais especificamente cães saudáveis e sem exposição prévia a antibioterapia, cujos tutores tenham sido previamente submetidos a antibioterapia e/ou frequentem ambientes hospitalares de medicina humana sejam mais frequentemente portadores de estirpes de *E. coli* resistentes.

Para tal foi necessário determinar a proporção de isolados de *E. coli* com perfil de resistência a antimicrobianos obtidos a partir das fezes de uma população canina da região de Lisboa, Portugal, bem como avaliar se determinadas características desses animais, tanto individuais como ambientais, podem constituir fator de risco para a presença de estirpes RAM.

### III. Materiais e Métodos

#### 1. Seleção dos indivíduos a incluir no estudo

Foram contactados cinco Centros de Atendimento Médico-Veterinários (CAMV) do distrito de Lisboa para integrar o presente estudo, que decorreu entre 26 de outubro de 2017 e 26 maio de 2018. Dois dos CAMV eram hospitais veterinários e os outros três eram clínicas veterinárias. O desenho do estudo foi sumariado e apresentado no fluxograma 1.

A espécie canina foi a única espécie animal incluída neste estudo, com o intuito de realizar uma análise de dados mais direta e objetiva.

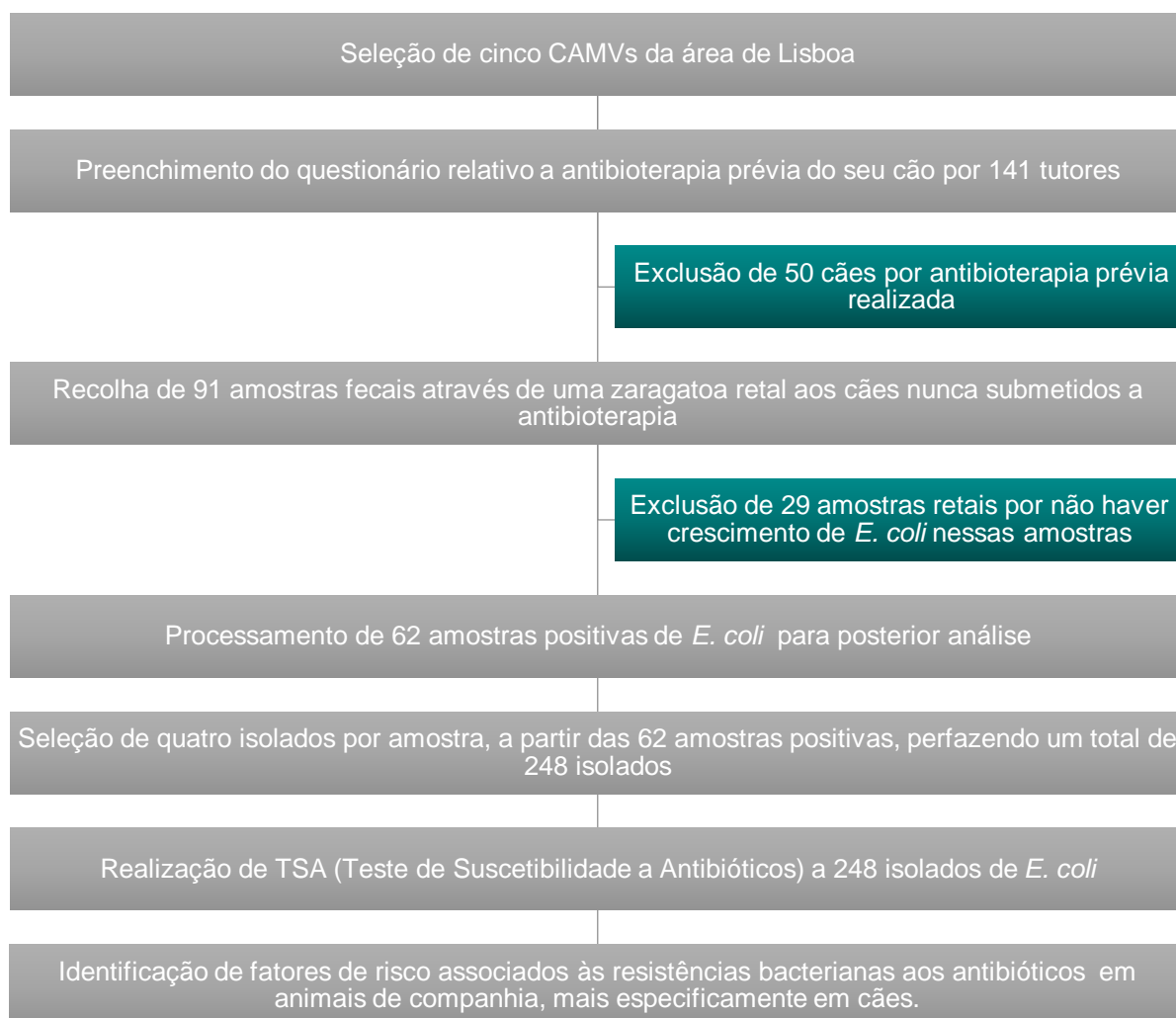
O processo de seleção dos cães a incluir no estudo ocorreu durante a visita aos supracitados CAMV, durante consultas de rotina com um médico veterinário. Como clínico responsável, o médico veterinário selecionou o animal através do seu historial clínico e posterior exame clínico, de modo a serem respeitados e cumpridos os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Foram definidos os seguintes critérios de exclusão: cães submetidos previamente a qualquer tipo de terapia antimicrobiana tópica ou sistémica; cães hospitalizados ou apresentados à consulta com qualquer tipo de doença; e cães internados nos últimos 12 meses. Para efeito único de preenchimento do questionário não foram aplicados os critérios de exclusão, sendo este fornecido aos tutores de cães.

O Médico Veterinário foi ainda responsável tanto pela colheita da amostra retal para posterior processamento laboratorial, bem como pela distribuição dos questionários aos tutores que apresentaram com os animais à consulta.

O consentimento dos tutores dos cães foi obtido pelo médico veterinário durante a consulta antes da recolha da amostra.

Era expectável desde o início do estudo que o número de cães saudáveis, nunca submetidos a tratamento com antimicrobianos e portadores de *E coli* resistente a antimicrobianos, fosse pequeno.

Fluxograma 1. Desenho do estudo. Um total de 91 amostras retais foram recolhidas de cães nunca sujeitos a antibioterapia prévia. Dessas 91 amostras fecais, 29 foram excluídas, uma vez que em nenhuma das culturas realizadas se registou a presença de *E. coli*. Foram utilizados para análise através de TSA um total de 248 isolados de *E. coli* obtidas a partir de 62 amostras.





## **2. Recolha da Amostra e preenchimento do Questionário**

Aos médicos veterinários que colaboraram neste estudo foi providenciado um sistema para colheita e transporte das amostras fecais, *ESwab*<sup>TM</sup> (*COPAN, Brescia, Itália*). Aos tutores foi pedido o preenchimento de um questionário de resposta fechada, de duas páginas, composto por 25 perguntas. O questionário na forma integral encontra-se apresentado em anexo (Anexo 1).

### **2.1. Recolha da amostra**

Previamente à recolha da amostra, o clínico obteve através do tutor o historial clínico do cão informações relativas ao estado de saúde do animal e à realização prévia de tratamentos antimicrobianos. Após confirmação de que o cão era clinicamente saudável e que nunca havia sido submetido a terapêutica antimicrobiana, o médico veterinário procedeu à recolha da amostra retal, utilizando uma zaragatoa floculada *ESwab*<sup>TM</sup>. Foi efetuada uma zaragatoa retal por animal, com introdução da mesma pelo menos um centímetro acima da linha de margem do ânus e realização de esfregaço de modo a que a zaragatoa apresentasse conteúdo fecal à vista desarmada, traduzindo uma boa qualidade de amostra.

Após a recolha, a amostra foi suspensa em 1 mililitro (ml) de meio líquido *Amies* e mantida refrigerada a 4°C até posterior processamento laboratorial no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

### **2.2. Questionário**

O questionário preenchido por cada tutor era constituído por duas páginas, com 25 perguntas, incluindo 22 perguntas de resposta fechada e 3 de resposta aberta (anexo 1). As respostas fechadas eram do tipo sim ou não. A resposta “Não sei” foi incluída em algumas perguntas de modo a evitar que o tutor respondesse incorretamente, caso não tivesse certeza da sua resposta. As respostas abertas visavam obter a idade do cão, o nome do antibiótico e tempo de duração da terapêutica antimicrobiana.

O questionário remetia para potenciais fatores de risco que pudessem estar relacionados com a ocorrência de resistências antimicrobianas, tendo sido desenvolvido em três fases: desenvolvimento concetual, validação e aplicação dos questionários.

#### **2.2.1. Desenvolvimento Concetual**

Na fase de desenvolvimento concetual a construção do questionário teve em conta uma revisão da literatura focada em estudos prévios (Han *et al.*, 2016; Leite-Martins *et al.*, 2014; Leonard *et al.*, 2015; Payne, Bennett, & McGreevy, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Stenske *et al.*, 2009; Wedley *et al.*, 2017) relacionados com o tipo de fatores de risco a avaliar, desde o historial clínico do cão ao tipo de frequência do meio hospitalar por parte do seu tutor.

O questionário foi dividido em duas secções, a primeira relativa ao animal e a segunda relativa ao tutor/agregado familiar. Na secção relativa ao cão, as questões escolhidas com base na

revisão da literatura efetuada compreenderam o historial médico (incluindo prescrição de antimicrobianos), a idade, o tipo de acesso ao exterior, o tipo de dieta, a relação/partilha de espaço doméstico entre cão e tutor, contato com outros animais ou pessoas do agregado familiar que tivessem sido submetidos a antimicrobianos e frequência de visitas ao veterinário. Na secção relativa ao tutor/agregado familiar do cão, o foco prendeu-se, sobretudo, no tipo de frequência de ambientes hospitalares de medicina humana (por motivos de saúde ou profissionais) e se tinham já sido submetidos a terapêutica antimicrobiana. O desenho do questionário visava uma leitura simples e rápida. Deste modo, as questões eram diretas e o tamanho do questionário não deveria exceder duas páginas, com um máximo de 25 questões.

### **2.2.2. Teste e Validação**

Numa segunda fase procedeu-se à validação do questionário através da sua submissão a um grupo de 16 pessoas, escolhidas por conveniência de modo a incluir uma diversidade de perfis, incluindo quatro médicos veterinários, quatro estudantes de medicina veterinária, três médicos de medicina humana, uma bióloga e quatro pessoas com profissões não relacionadas com a área da saúde.

As alterações propostas ao questionário focaram-se na forma de apresentação da idade, no tipo de doenças que deviam ser abrangidas como causa de prescrição prévia de antibióticos e nas designações apresentadas como o tipo de acesso ao exterior do cão.

O questionário final foi elaborado tendo em conta as alterações sugeridas e submetido de novo ao mesmo grupo de pessoas para validação. O tempo médio de preenchimento do questionário foi de dois minutos e considerado como de fácil entendimento e rápido preenchimento.

### **2.2.3. Aplicação**

A terceira e última fase envolveu a distribuição dos questionários pelos vários CAMV que aderiram ao estudo previamente mencionados no ponto um, para o seu posterior preenchimento pelos tutores dos cães presentes à consulta.

### 3. Isolamento, identificação e conservação de isolados de *E. coli*

Foram recolhidas 91 zaragatoas fecais caninas, das quais 62 se revelaram positivas para *E. coli*, sendo as restantes 29 excluídas do estudo, uma vez que não se observou a multiplicação de *E. coli* a partir destas. Das 62 amostras positivas foram selecionados quatro isolados por amostra, perfazendo um total de 248 isolados a incluir neste estudo.

Todas as 91 amostras foram semeadas por esgotamento em estria em meio agar de MacConkey (*Oxoid*<sup>®</sup>, Cheshire, UK), e posteriormente incubadas a 37°C durante 24h. Após incubação, avaliou-se a morfologia para seleção de colónias típicas de *E. coli*, com cor rosa forte correspondente à utilização da lactose do meio de MacConkey e com halo de precipitação de sais biliares.

As colónias selecionadas foram posteriormente semeadas em meio agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (*BioMérieux*<sup>®</sup>, Marcy-l'Étoile, France) através da técnica de sementeira por esgotamento em estria, incubando a 37°C durante 24h. Em seguida a identificação dos isolados foi realizada através da observação microscópica e de métodos bioquímicos, como o teste da oxidase e o teste IMViC (*Indole-Methyl Red-Voges Proskauer-Citrate*), que requer a incubação dos isolados nos meios agar citrato de Simmons, agar Sim e MR-VP (*Methyl Red, Voges - Proskauer*) (Quinn *et al.*, 2011).

Os isolados Gram negativos, oxidase negativa, móveis (meio agar Sim), não produtores de ácido sulfídrico (meio agar Sim), produtores de indol (meio agar Sim), utilizadores de triptofano (meio agar Sim), não utilizadores de citrato (meio agar citrato de Simmons) e nem de glucose (meio MR-VP) foram considerados como pertencentes à espécie *E. coli* (Quinn *et al.*, 2011). Após obtenção e identificação dos isolados pertencentes à espécie *E. coli* estes foram criopreservados em duplicado, em meio de água peptonada tamponada contendo glicerol a 20% e armazenados a -20°C durante todo o período de realização dos ensaios.

#### 4. Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

O perfil de suscetibilidade dos 248 isolados de *E. coli* obtidos foi determinado através do teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) realizado através do método de difusão em disco de *Kirby-Bauer*, de acordo com as diretrizes do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2018).

Os antibióticos testados foram selecionados de modo a incluir aqueles regularmente utilizados em medicina humana e veterinária e a representar diferentes classes de antimicrobianos, tendo em conta as recomendações do documento *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals* (CLSI, 2018) e ainda considerando a classificação da OMS relativamente a Antimicrobianos Criticamente Importantes para a Medicina Humana (WHO, 2017).

Todos os antibióticos foram adquiridos à empresa *MAST Group Ltd., Liverpool, UK*. Como estirpe controlo foi utilizada a estirpe referência *E. coli* ATCC® 25922 (*American Type Culture Collection*).

Previamente à realização do teste de suscetibilidade aos antibióticos, para cada isolado foram realizadas duas passagens em placas com meio TSA (Tryptone Soy Agar), através da técnica de sementeira por esgotamento em estria, sendo as placas incubadas a 37°C durante 24h. A partir da segunda cultura em meio TSA foram realizadas suspensões bacterianas em soro fisiológico a 0.9%, com o grau de turvação de 0,5 na escala de *McFarland* (bioMérieux®) determinado através da utilização de um densitómetro, sendo equivalente a uma concentração bacteriana de 10<sup>8</sup> UFC/mL. A partir desta suspensão foi realizada uma sementeira em tapete em meio agar *Müller-Hinton* (Oxoid®), com o auxílio de uma zaragatoa.

Em todos os TSA foi testado um conjunto idêntico de 13 discos de antibióticos de oito categorias antimicrobianas, sumarizados na tabela 4 e na figura 5.

Posteriormente, as placas com os discos foram incubadas a 37°C durante 18 a 20 horas. Após este período foi realizada a observação das placas, registando-se a ocorrência ou ausência de halos de inibição de multiplicação bacteriana e a medição do diâmetro dos halos de inibição, em milímetros. Para interpretação dos resultados e consequente avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados foram utilizadas as recomendações do documento *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals* (suplemento VET02-S1) (CLSI, 2018), sumarizadas na tabela 4.

As recomendações do documento *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (suplemento M100-S25) (CLSI, 2015) relativas a limites específicos para medicina humana foram consideradas, sempre que não se encontravam estipulados limites específicos para isolados de origem veterinária.

De acordo com o estipulado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), a prevalência das

resistências dos isolados de *E. coli* a cada antibiótico foi classificada segundo as seguintes categorias: rara, <0,1%; muito baixa, 0,1% a 1,0%; baixa, > 1% a 10,0%; moderada, > 10,0% a 20,0%; alta, > 20,0% a 50,0%; muito alta, > 50,0% a 70,0%; e extremamente alta, > 70,0% (European Food Safety Authority [EFSA] & ECDC, 2018).

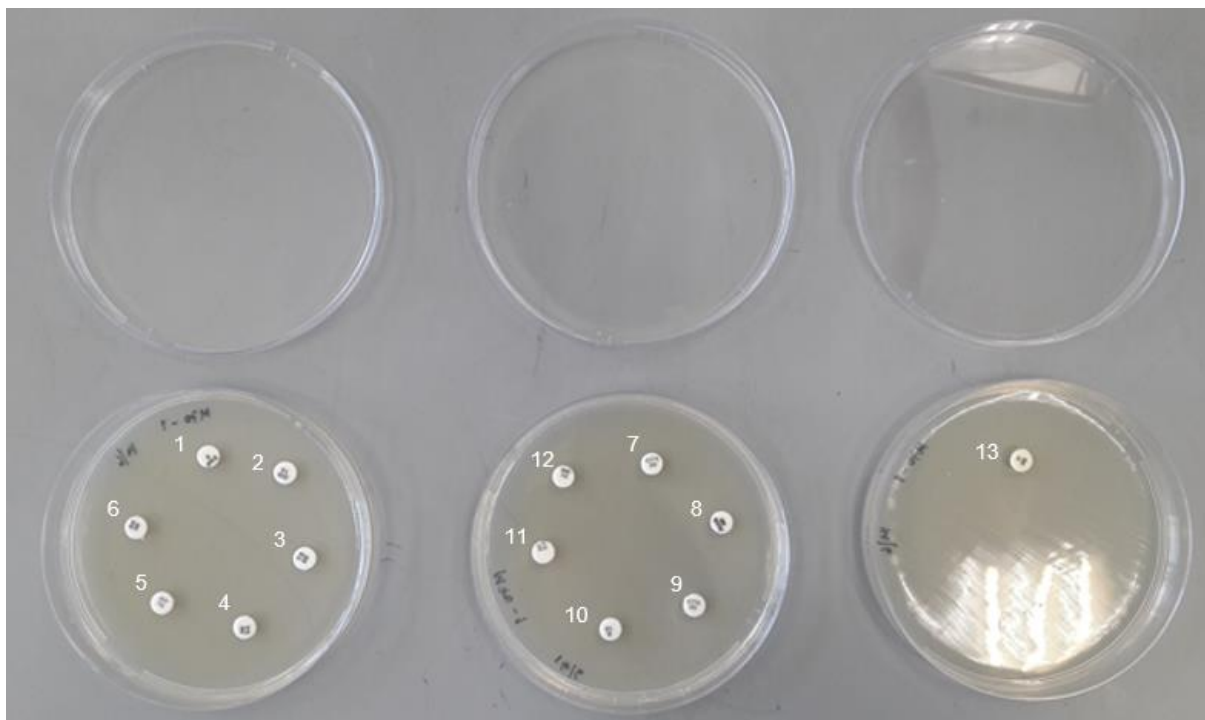
Tabela 4. Antibióticos em estudo e respectivas abreviaturas do nome, concentração do disco (µg) e critérios CLSI para o diâmetro do halo (mm). Adaptada do suplemento VET02-S1 e M100-S23, CLSI (2018) e Magiorakos et al. (2011)

Antibiótico	Abreviatura do Antibiótico	Concentração no disco (µg)	Critérios CLSI (diâmetro do halo em mm)		
			S	I	R
Aminoglicosídeos					
Amicacina	AK	30	≥17	15-16	≤14
Estreptomicina	S	10	≥15	12-14	≤11
Gentamicina	GM	10	≥15	13-14	≤12
Carbapenemos					
Imipenem*	IMI	10	≥16	14-15	≤13
Cefalosporinas					
Cefalexina*	CFX	30	≥18	15-17	≤14
Cefotaxima*	CTX	30	≥23	15-22	≤14
Fenicóis					
Cloranfenicol	C	30	≥18	13-17	≤12
Penicilinas					
Ampicilina*	AP	10	≥17	14-16	≤13
Amoxicilina + Ácido clavulânico*	AUG	30	≥18	14-17	≤13
Quinolonas					
Ácido Nalidíxico	NA	30	≥19	14-18	≤13
Enrofloxacin	ENF	5	≥23	17-22	≤16
Sulfonamidas					
Trimetoprim + Sulfametoxazol*	TS	25	≥16	11-15	≤10
Tetraciclinas					
Tetraciclina*	T	30	≥19	15-18	≤14

Legenda: S - Sensível; I - Intermédio; R – Resistente; µg: micrograma (10<sup>-6</sup>)

\* limites estabelecidos pelo documento M100-S25 do CLSI

Figura 5. Placas de TSA, com meio *Müller-Hinton* e discos dos vários antibióticos em estudo: enrofloxacina (1), gentamicina (2), trimetoprim+sulfametoxazol (3), cloranfenicol (4), ampicilina (5), amicacina (6), cefalexina (7), amoxicilina + ácido clavulânico (8), cefotaxima (9), estreptomicina (10), ácido nalidíxico (11), Imipenem (12), tetraciclina (13). Original.



Durante o estudo foram utilizadas as definições de multirresistente (MDR), extremamente resistente (XDR) e panresistente (PDR) para caracterizar diferentes padrões de resistências a antimicrobianos, tendo como base uma proposta internacional para definições *standard* de resistências adquiridas, apresentadas por Magiorakos *et al.* (2012) no estudo *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Neste estudo os agentes antimicrobianos foram agrupados nas suas respectivas categorias antimicrobianas para posterior interpretação segundo os padrões de resistências (MDR, XDR e PDR).

O padrão MDR foi definido como a não suscetibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas. O padrão XDR foi definido como a não suscetibilidade a pelo menos um agente em todas as categorias, com exceção de duas ou menos categorias antimicrobianas (ou seja, os isolados bacterianos permanecem suscetíveis a apenas uma ou duas categorias). O padrão PDR foi definido como a não suscetibilidade a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (Magiorakos *et al.*, 2012).

## 5. Análise Estatística

Os dados obtidos através dos questionários e a informação relativa aos resultados dos TSA foram registados num ficheiro *Microsoft Excel 2013*<sup>®</sup> e analisados através do programa de análise estatística *R Studio*, versão 3.5.1. (R Studio, 2018).

As variáveis foram renomeadas com o objetivo de simplificar a apresentação dos resultados; por exemplo, “Acesso ao Exterior Livre (cão entra e sai quando quer)” foi categorizado como AcessoLivreExt.

Os potenciais fatores de risco obtidos a partir do questionário foram analisados como variáveis categóricas, mais especificamente variáveis dicotómicas e variáveis categóricas com mais de dois níveis. As variáveis dicotómicas são as seguintes: saudável (sim, não), desparasitado (sim, não), vacinado (sim, não), esterilizado (sim, não), exposição do animal a antibioterapia prévia (sim, não), conhecimento do nome do antibiótico administrado ao animal (sim, não), acesso do animal à cama/sofá dos tutores (sim, não), acesso do animal a objetos pessoais do tutor (sim, não), animal demonstra afeto lambendo a cara/mãos do tutor (sim, não), animais coabitantes (sim, não), animal coabitante realizou antibioterapia prévia (sim, não), tutor frequentou o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriu o animal (sim, não), tutor frequentou o meio hospitalar de medicina humana no último ano (sim, não), animal em contato com tutor sujeito a cuidados continuados (sim, não), tutor realizou antibioterapia prévia (sim, não), conhecimento do tutor relativamente ao nome do antibiótico administrado (sim, não).

As variáveis categóricas com mais de dois níveis foram as seguintes: tipo de situação para a qual o antibiótico foi administrado ao animal (gastrointestinal, oftalmologia, respiratória, otites, dermatológica, como medicação pós cirúrgica); tipo de médico que aconselhou o último tratamento antimicrobiano (médico veterinário, médico de medicina humana, amigos/conhecidos não ligados à área da saúde); dieta (seca, húmida, crua, caseira, guloseimas); tipo de acesso ao exterior (permanente, acesso livre, passeio à tela, nenhum), espécies dos animais coabitantes (cão, gato, lagomorfo, réptil, roedor, peixes); frequência das visitas ao hospital veterinário (anual, semestral, trimestral, mensal, semanal, diária); situação pela qual frequenta o meio hospitalar de medicina humana (profissional, consulta, voluntariado, visita a familiar/amigo, cirurgia/internamento) e tipo de situação profissional (médico, enfermeiro, técnico de saúde, auxiliar de ação médica, laboratório, secretariado, não relacionada com o meio hospitalar). A variável idade foi transformada em variável categórica usando três níveis: “jovem” (menos de 18 meses de idade), “adulto” (entre 19 meses e 6 anos de idade) e “sénior” (mais de 7 anos de idade) (Bartges *et al.*, 2012).

O resultado das resistências antimicrobianas dos 248 isolados foi categorizado em sensível, intermédio ou resistente para a análise, sendo que para o tratamento estatístico da informação relativa dos 62 cães este foi dicotomizado como resistente ou sensível. Os resultados intermédios foram categorizados como resistentes (n=62).

Os dados foram analisados utilizando regressão logística univariada e multifatorial e apresentados utilizando estatística descritiva e distribuição de frequências. A regressão logística foi utilizada para avaliar interações entre variáveis e controlar possíveis variáveis de confundimento.

As categorias MDR, XDR e PDR foram modeladas separadamente, dado que as três categorias descrevem padrões de resistência diferentes. Os modelos de regressão logística multifatorial foram desenvolvidos utilizando as extensões *lme4* (*Linear Mixed-Effects Models using 'Eigen' and S4*) (Bates et al., 2018) e *MASS* (*Modern Applied Statistics with S*) (Ripley et al., 2018), de forma a avaliar a associação entre os potenciais fatores de risco em estudo e a prevalência de resistência a antimicrobianos dos isolados de *E. coli*, categorizados nos padrões de resistências MDR, XDR e PDR. Para os dados relativos dos 62 animais foi realizada uma regressão logística multifatorial utilizando modelos lineares generalizados (*generalized linear models*) (GLM). Para os 248 isolados foi realizada uma regressão logística multifatorial utilizando modelos lineares de efeitos-mistos generalizados (*generalized linear mixed-effects models*) (GLMEM), usando o animal como fator aleatório, tendo em conta que foi analisado mais do que um isolado de *E. coli* em cada animal.

Esta análise foi dividida em quatro passos: (1) análise univariada, utilizando o teste exato de Fisher, para avaliar a relação individual entre cada potencial fator de risco e a presença de bactérias antibiorresistentes associada a cada padrão de resistência (MDR, XDR e PDR) e antibioterapia prévia realizada; (2) seleção de todas as variáveis com um valor  $p$  inferior a 0,2 do modelo anterior; (3) avaliação da correlação entre as variáveis anteriores, sendo que nos casos de correlação positiva, foram selecionadas as variáveis com maior sentido biológico, para inclusão num modelo saturado (regressão logística multifatorial); (4) seleção do modelo final, realizando um processo passo a passo (*stepwise regression*) para a análise multifatorial GLM, e um processo manual regressivo e progressivo de seleção de variáveis (*manual backwards and forwards regression*) para a análise multifatorial GLMEM. Em ambos os processos de seleção do modelo final, as variáveis foram sendo eliminadas e o ajuste do modelo avaliado pelo AIC (*Akaike Information Criterion*), sendo que o melhor modelo foi selecionado utilizando o menor AIC.

O valor de  $p$ , *odds ratio* com um intervalo de confiança de 95% e desvio padrão foram também calculados para os modelos finais. Nos modelos finais, apenas foram selecionados fatores com valores de  $p$  inferiores a 0,05. O nível de significância estatística foi assumido como sendo igual a 0,05 (5% significância). Neste estudo, a hipótese nula,  $H_0$ , define a ausência de associação estatística significativa entre o fator predisponente e o resultado de interesse. Assim, um valor  $p$  igual ou menor do que 0,05 significa que a hipótese nula foi rejeitada e que uma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre o fator predisponente e o resultado de interesse.



## **IV. Resultados**

### **1. Caracterização da população em estudo**

Dos 141 cães em estudo, 95% eram saudáveis, 92% encontravam-se desparasitados e vacinados, enquanto apenas 33% tinham sido esterilizados, como pode ser consultado no gráfico 2.

Quanto à caracterização etária dos grupos em estudo (n=141) observou-se que a grande maioria, quase metade (44%) dos participantes eram jovens (até aos 18 meses de idade), 36,7% eram adultos (dos 19 meses até aos seis anos de idade) e 18,4% eram seniores (a partir dos 7 anos de idade) (gráfico 3).

Foi também possível observar que dos 141 cães em estudo, 50 (35,5%) já tinham sido expostos a antibioterapia prévia, enquanto 91 (64,5%) não tinham sido submetidos a antibioterapia prévia (gráfico 4).

A exposição a antibioterapia prévia foi ainda relacionada com a idade da população em estudo (n=141) (gráfico 5), sendo possível observar que o grupo etário com maior exposição a antibioterapia era o grupo de cães seniores, com idades iguais ou superiores a 7 anos (76,9%), seguido do grupo de cães adultos, com idades compreendidas entre os 19 meses e os 6 anos (43,4%), sendo o grupo de cães mais jovens, com idades entre um mês e 18 meses de idade (11,3%) o que teve menor exposição a antibioterapia.

De entre os animais participantes que já tinham sido expostos a antibioterapia prévia (n=50) são apresentadas no gráfico 6 o tipo de situação para a qual foi administrado o antibiótico, sendo que o mesmo cão pode ter sido medicado para mais do que uma das situações apresentadas. O uso de antibioterapia como medicação pós cirúrgica foi observado em 54,0% casos, sendo a situação mais frequente para administração de antibiótico em prática clínica. Outros tipos de situação em que o uso de antibioterapia se revela frequente são os 36,0 % casos de otite e os 26% casos de oftalmologia. As situações dermatológicas, gastrointestinais, ambas com 14,0% casos registados, e respiratórias, com 10,0% casos registados, representam as afeções em que menos se utilizam antibióticos. Por fim, três dos tutores que responderam ao questionário não sabiam para que tipo de situação tinha sido utilizado o antibiótico.

Foi ainda realizada uma comparação entre quem teria aconselhado o tratamento com antibióticos aos cães previamente expostos a antibioterapia (n=50), se um médico veterinário ou um médico de medicina humana. Nesta situação observaram-se 48 (96,0%) casos em que o tratamento foi aconselhado pelo médico veterinário, contra uma minoria de dois (4,0%) casos em que o tratamento foi aconselhado por um médico de medicina humana (gráfico 7).

Gráfico 2. Características gerais da população em estudo (Estado de Saúde, Desparasitado, Vacinado e Esterilizado)

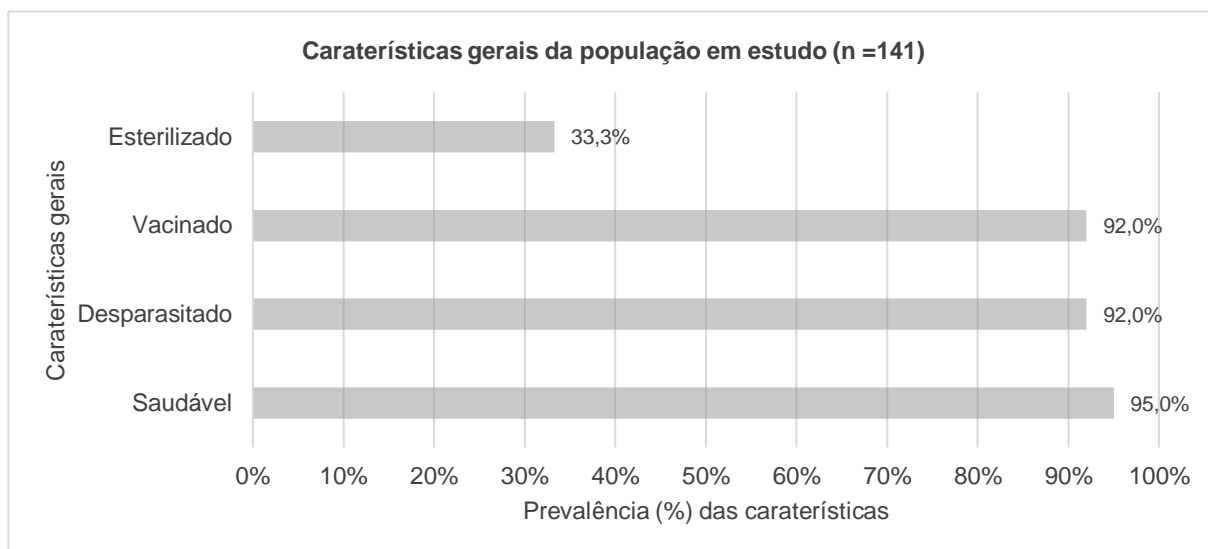


Gráfico 3. Idade da população em estudo. Idade definida por estratos: Jovem, Adulto e Sênior

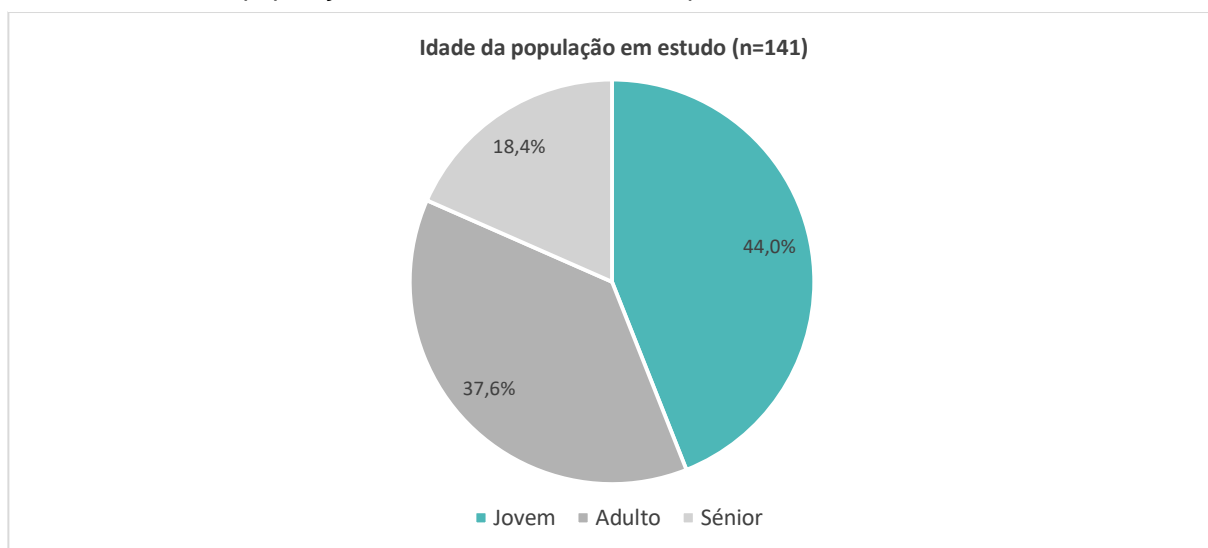


Gráfico 4. Antibioterapia prévia realizada pela população em estudo

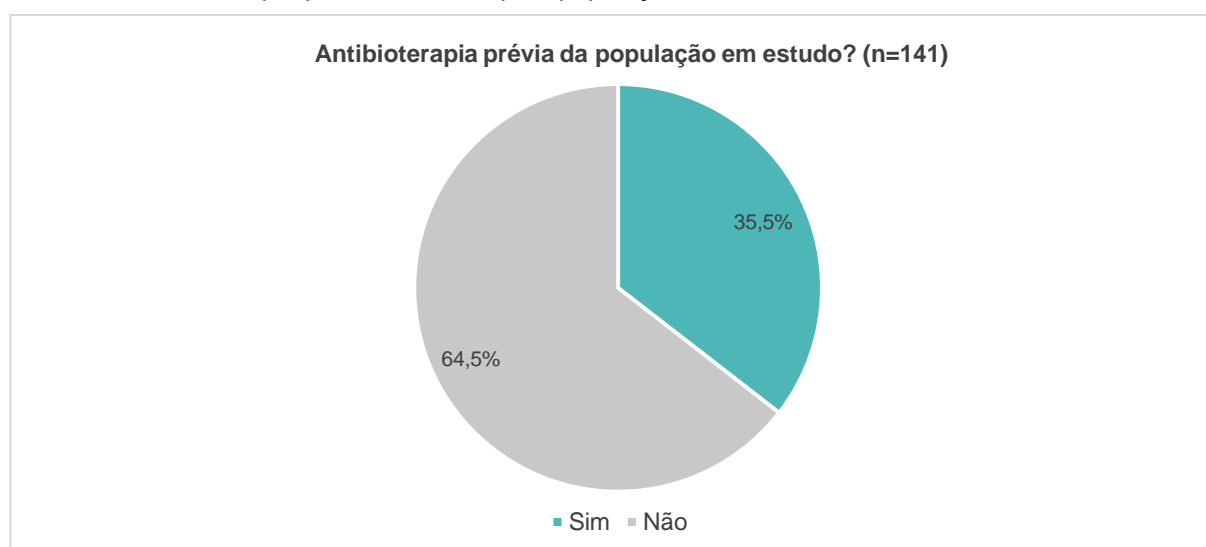


Gráfico 5. Exposição a antibioterapia prévia segundo a idade do animal (n=141).

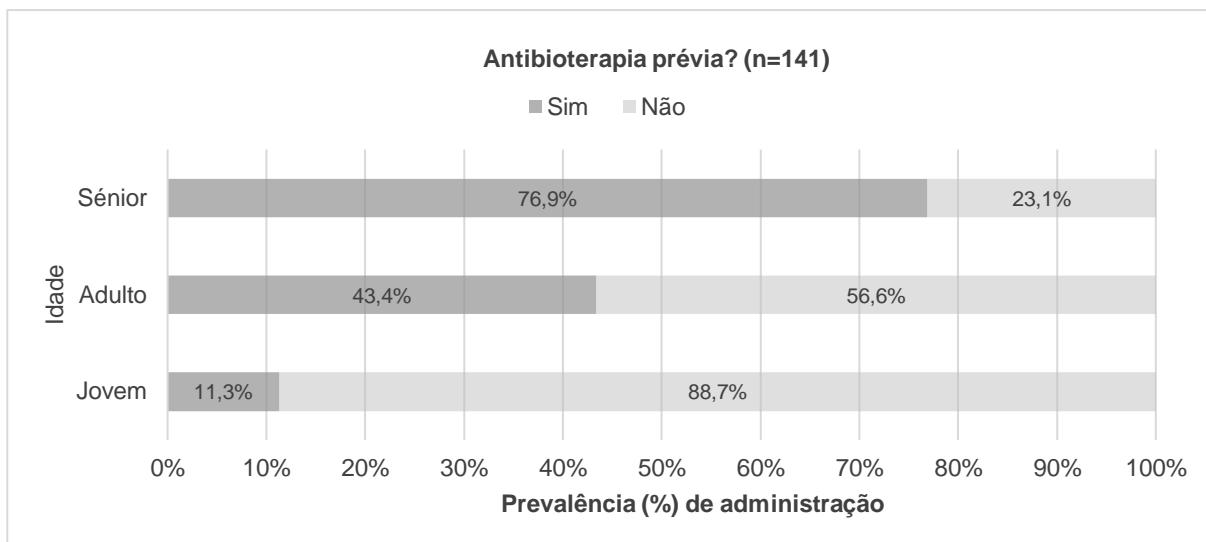


Gráfico 6. Situação subjacente que condiciona a administração do antibiótico à amostra em estudo

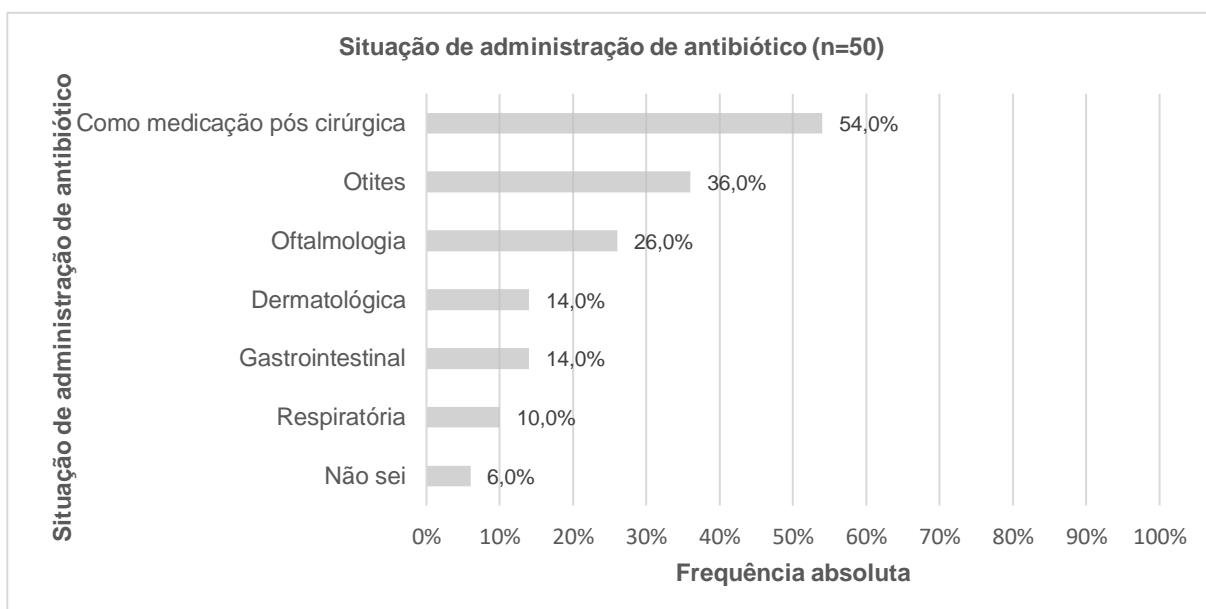
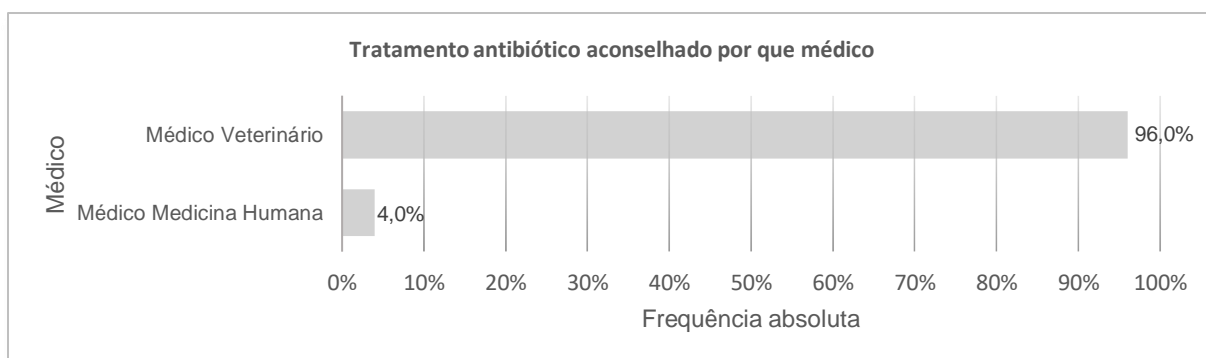


Gráfico 7. Prescrição efetuada a conselho de Médico Veterinário Vs Médico de Medicina Humana



## 2. Fatores de risco associados a uma exposição prévia a antibiótico

Utilizando o teste exato de *Fisher* foi realizada uma análise univariada na qual se avaliou a associação das variáveis apresentadas no questionário com a exposição ou não do cão a antibioterapia prévia.

A exposição do cão a antibioterapia prévia ( $n=141$ ) mostrou estar relacionada com as seguintes variáveis: esterilização, idade do animal, tipo de acesso ao exterior – passeio à trela ou nenhum tipo de acesso ao exterior, frequência das visitas ao médico veterinário, frequência de meios hospitalares humanos por parte do tutor desde que adquiriu o animal, frequência por parte do tutor de serviços de cirurgia e internamento em meio hospitalar humano e, por fim, exposição do tutor a antibioterapia prévia (anexo 2).

Quanto à esterilização ( $p<0,001$ ) (OR 18,14 [7,16; 50,00]) foi possível verificar que 85,1% dos cães não esterilizados, não tinham sido expostos a qualquer tipo de antibioterapia prévia, enquanto 76,6% dos cães esterilizados tinham já sido expostos a antibioterapia prévia. Logo os cães submetidos a esterilização têm um risco maior de terem feito antibioterapia.

Relativamente à idade do animal ( $p<0,001$ ) (OR\_jovem 0,17 [0,06;0,43]; OR\_senior 4,35 [1,5;12,6]) foi possível observar que o grupo de cães jovens foi o menos exposto a antibioterapia prévia (88,70%), enquanto 76,90% dos cães do estrato de idade sénior já havia realizado antibioterapia. Assim, com o aumento da idade o risco de exposição prévia à antibioterapia aumenta significativamente.

Quanto ao tipo de acesso ao exterior através do passeio à trela ( $p=0,027$ ) (OR 2,41 [1,05; 5,93]) foi possível observar que estes cães tinham maior risco de ter sido expostos a uma terapêutica antimicrobiana prévia.

Verificou-se que 100% dos cães que não têm nenhum tipo de acesso ao exterior ( $p<0,001$ ) (OR 0 [0,00;0,27]) também nunca foi exposto a qualquer tipo de antibioterapia prévia, logo estes cães apresentam um menor risco de serem submetidos a terapêutica antimicrobiana.

A frequência das visitas ao médico veterinário ( $p<0,001$ ) é também um fator condicionante para a exposição ou não a antibioterapia, verificando-se que 96,80% dos cães que frequentam mensalmente o médico veterinário nunca foram submetidos a antibioterapia prévia, contrastando com os cães que já foram submetidos à mesma e cuja frequência é semestral (69,2%) ou anual (49,2%). Desta forma, com o aumento da frequência de visita do animal ao médico veterinário o risco de ter sido submetido a terapêutica antimicrobiana diminuía significativamente.

A frequência de meios hospitalares humanos por parte do tutor desde que adquiriu o animal ( $p=0,034$ ) (OR 2,91 [1,06;9,38]) é relacionável com antibioterapia prévia realizada pelo cão, na medida em que 81,20% dos tutores que não frequentaram o meio hospitalar de medicina humana nunca submeteram o seu cão a qualquer tipo de antibioterapia prévia. Por outro lado, menos de 50% dos tutores que frequentam o meio hospitalar submeteram o seu cão a este tratamento. Verificou-se ainda que 68,80% dos tutores que estiveram internados ou

realizaram algum tipo de procedimento cirúrgico ( $p<0,001$ ) (OR 3,91 [3,03;16,23]) têm cães que já foram expostos a tratamento com antibióticos. Desta maneira, os cães cujos tutores frequentam meios hospitalares humanos e que estiveram internados ou que realizaram algum procedimento cirúrgico desde que adquiriram o animal têm um maior risco de ter sido expostos a antibioterapia prévia.

A exposição do tutor a antibioterapia prévia ( $p<0,001$ ) (OR 6,87 [3,03;16,23]) encontra-se relacionada com a antibioterapia prévia do cão, uma vez que 81,20% dos cães cujos tutores nunca foram expostos a tratamentos com antibióticos também nunca foram expostos a antibioterapia prévia, enquanto o contrário também se verifica, sendo que 61,80% dos cães com tutores que realizaram antibioterapia prévia realizaram também este tipo de terapêutica. Logo os cães cujos tutores já foram expostos a antibioterapia prévia têm um maior risco de ter sido submetidos a uma terapêutica antimicrobiana prévia.

### 3. Caracterização dos perfis de resistência dos isolados

Das 91 amostras fecais recolhidas de cães sem exposição prévia a antibioterapia, 62 (68,1%) foram positivas para a presença de *E. coli*.

Os resultados dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos testados, assim como os resultados referentes a cada um dos padrões de resistência definidos como MDR, XDR e PDR encontram-se apresentados nas tabelas 5 e 6 e nos gráficos 8, 9, 10 e 11. São apresentados resultados tanto para os 248 isolados (quatro isolados por cada cão), como para as 62 amostras fecais dos cães em estudo. Esta distinção foi importante, pois a análise das resistências dos 248 isolados permite identificar com uma maior probabilidade a presença de eventuais isolados resistentes no animal. Posteriormente, estes 248 isolados foram agregados pelos 62 animais em estudo, sendo o animal classificado em função da ocorrência de pelo menos um isolado MDR, XDR e PDR.

Nos 248 isolados registaram-se valores de diâmetro de suscetibilidade, intermédio e resistência relativamente aos antibióticos. Nos 62 resultados agrupados referentes aos 62 cães os resultados intermédios foram agrupados com os resistentes, de modo a ter apenas duas categorias: suscetibilidade ou não suscetibilidade (resistência) ao antibiótico.

#### 3.1. Prevalência

Apenas 35,50% dos cães, enquanto indivíduo (n=62), mostraram ser portadores de isolados de *E. coli* resistentes ao imipenem, sendo este o antibiótico com menor prevalência de resistência, enquanto quase a totalidade dos cães envolvidos no estudo, 91,90%, mostrou ser portador de isolados resistentes à cefalexina. Quanto aos restantes antibióticos estudados observaram-se as seguintes prevalências de resistência dos cães (n=62) por ordem decrescente: tetraciclina (85,50%), ácido nalidíxico (80,70%), ampicilina (74,2%), trimetoprim associado ao sulfametoxazol (69,40%), enrofloxacina (66,10%), cloranfenicol, amoxicilina associada ao ácido clavulânico e amicacina (56,50%), gentamicina (51,60%), estreptomicina (50,00%) e cefotaxima (46,80%) (tabela 5, gráfico 8).

A prevalência da RAM (n=248) variou entre 16,10% para o imipenem e 83,10% para a cefalexina. Por ordem decrescente, as prevalências de resistência aos antibióticos estudados foram as seguintes: cefalexina (83,10%), ácido nalidíxico (62,10%), tetraciclina (60,10%), ampicilina (52,4%), trimetoprim e sulfametoxazol (44,8%), enrofloxacina (43,50%), amoxicilina associada ao ácido clavulânico (35,10%), cloranfenicol (33,10%), gentamicina (31,9%), amicacina (30,2%), estreptomicina (29,40%), cefotaxima (22,6%) e imipenem (16,1%) (tabela 5, gráfico 10).

De acordo com as recomendações da EFSA (EFSA & ECDC, 2018) para categorias de risco segundo níveis de resistência, apenas a cefalexina, dos antibióticos estudados, se enquadrava na categoria de resistência extremamente alta, com uma prevalência de resistência de 83,1%; o ácido nalidíxico, a ampicilina e a tetraciclina enquadravam-se na

categoria de prevalência de resistência muito alta; a amicacina, a amoxicilina associado ao ácido clavulânico, a cefotaxima, o cloranfenicol, a enrofloxacin, a estreptomicina, a gentamicina e o trimetoprim associado ao sulfametoxazol enquadravam-se na categoria de prevalência de resistência alta e apenas o imipenem enquadrava-se na categoria de prevalência de resistência moderada, como é demonstrado na tabela 6.

### **3.2. Padrões e perfis de resistência a antimicrobianos**

Tanto os 248 isolados, como os resultados agrupados em 62 animais demonstraram uma elevada multirresistência aos antibióticos estudados, 177/248 (71,4%) e 55/62 (88,7%), respectivamente. Porém, ambos os grupos revelaram valores abaixo de 50% para a resistência extensiva e panresistência aos antibióticos. Dos 248 isolados, 59 (23,8%) eram extensivamente resistentes e 30 (12,1%) eram panresistentes aos antibióticos estudados. Dos resultados agrupados dos 62 animais, 25 (40,3%) eram extensivamente resistentes e 17 (27,4%) eram panresistentes (tabela 5, gráficos 9 e 11).

Relativamente aos resultados agrupados (n=62), foram ainda identificados 4 perfis únicos de antibiorresistência. Assim, os isolados de 54,80% dos animais apresentavam 4 tipos diferentes de perfil de resistência, ou seja, os 4 isolados de *E. coli* provenientes desse animal apresentavam perfis de suscetibilidade aos antibióticos distintos; os isolados de 27,40% dos animais apresentavam 3 tipos diferentes de perfil de resistência; os isolados de 13,00% dos animais apresentavam 2 tipos diferentes de perfil de resistência; e os isolados de apenas 4,80% dos animais apresentavam um tipo único de perfil de resistência, ou seja, todos os quatro isolados de *E. coli* provenientes desse animal apresentavam o mesmo perfil de suscetibilidade aos antibióticos (gráfico 12).

Foram identificados 126 perfis de antibiorresistência diferentes nos 248 isolados analisados. Fazendo esta análise por isolado (n=248), verificou-se que a maior prevalência de isolados multirresistentes (46,60%) correspondia aos animais que apresentavam isolados com 4 perfis únicos de antibiorresistência, seguido dos que apresentavam 3 (19,80%) e 2 perfis únicos (5,10%). Os isolados que pertenciam a animais com um tipo único de perfil de resistência (4,80%) não possuíam um perfil de multirresistência, ou seja, apresentaram uma maior probabilidade de ser suscetíveis a vários compostos antimicrobianos pertencentes a diferentes classes (gráfico 13).

Tabela 5. Prevalência da suscetibilidade e resistência dos isolados de *E. coli* relativamente aos antibióticos utilizados (n=248 e n=62.)

Antibiótico	Isolados (n=248)			Cães* (n=62)	
	S	I	R	S	R
Ácido Nalidíxico	61 24,6%	33 13,3%	154 62,1%	12 19,3%	50 80,7%
Amicacina	137 55,2%	36 14,5%	75 30,2%	33 53,5%	29 46,5%
Ampicilina	81 32,7%	37 14,9%	130 52,4%	16 25,8%	46 74,2%
Amoxicilina + Ácido clavulânico	106 42,7%	55 22,2%	87 35,1%	27 43,5%	35 56,5%
Cefalexina	29 11,7%	13 5,2%	206 83,1%	5 8,1%	57 91,9%
Cefotaxima	116 46,8%	76 30,6%	56 22,6%	33 53,2%	29 46,8%
Cloranfenicol	150 60,5%	16 6,5%	82 33,1%	27 43,5%	35 56,5%
Enrofloxacina	85 34,3%	55 22,2%	108 43,5%	21 33,9%	41 66,1%
Estreptomicina	97 39,1%	78 31,5%	73 29,4%	31 50%	31 50%
Gentamicina	152 61,3%	17 6,9%	79 31,9%	30 48,4%	32 51,6%
Imipenem	196 79,0%	12 4,8%	40 16,1%	40 64,5%	22 35,5%
Tetraciclina	49 19,8%	50 20,2%	149 60,1%	9 14,5%	53 85,5%
Trimetoprim + Sulfametoxazol	128 51,6%	9 3,6%	111 44,8%	19 30,6%	43 69,4%
MDR	71 28,6%	-	177 71,4%	7 11,3%	55 88,7%
XDR	189 76,2%	-	59 23,8%	37 59,7%	25 40,3%
PDR	218 87,9%	-	30 12,1%	45 72,6%	17 27,4%

\* Os isolados com perfil intermédio foram agregados aos isolados resistentes.



Tabela 6. Categorização dos antibióticos testados contra os isolados de *E. coli* (n=248) de acordo com as categorias de risco da EFSA para a prevalência da resistência. Categorias de risco: rara, <0,1%; muito baixa, 0,1% a 1,0%; baixa, > 1% a 10,0%; moderada, > 10,0% a 20,0%; alta, > 20,0% a 50,0%; muito alta, > 50,0% a 70,0%; e extremamente alta, > 70,0% (EFSA & ECDC, 2018)

Categorias de risco para níveis de resistência (EFSA)	Antibiótico	Prevalência da resistência
Extremamente alta > 70,0%	Cefalexina	83,1%
Muito alta > 50,0% a 70,0%	Ácido Nalidíxico	62,1%
	Tetraciclina	60,1%
	Ampicilina	52,4%
Alta > 20,0% a 50,0%;	Trimetoprim+Sulfametoxazol	44,8%
	Enrofloxacina	43,5%
	Amoxicilina + Ácido clavulânico	35,1%
	Cloranfenicol	33,1%
	Gentamicina	31,9%
	Amicacina	30,2%
	Estreptomicina	29,4%
	Cefotaxima	22,6%
Moderada > 10,0% a 20,0%	Imipenem	16,1%
Baixa > 1% a 10,0%	-	0,0%
Muito baixa 0,1% a 1,0%	-	0,0%
Rara <0,1%	-	0,0%

Gráfico 8. Prevalência de resistência dos isolados de *E. coli* agrupados por animal (n=62) a cada antibiótico estudado (ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, Imipenem, tetraciclina e trimetoprim+sulfametoxazol).

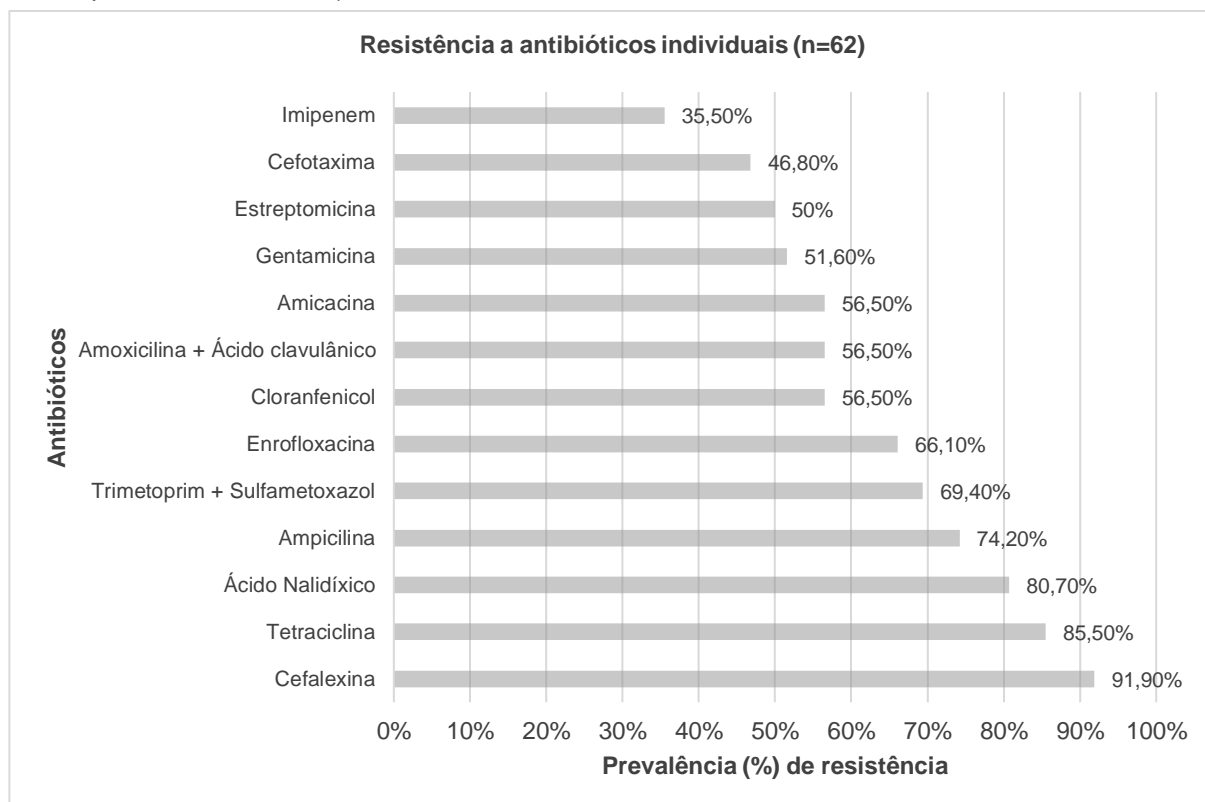
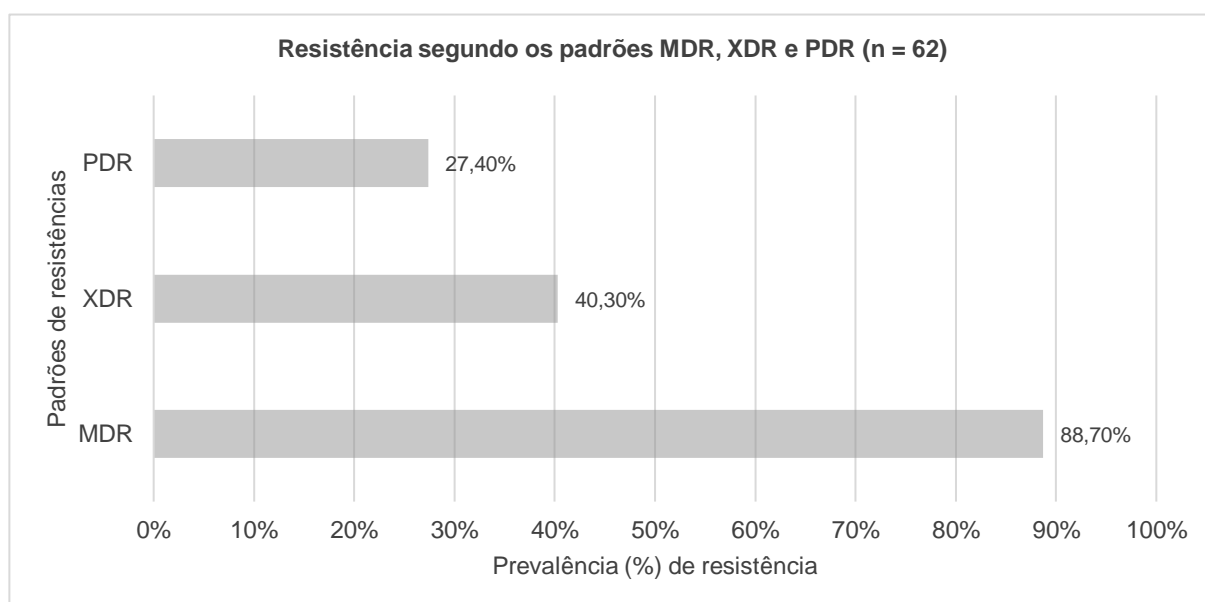


Gráfico 9. Prevalência da resistência dos isolados de *E. coli* agrupados por animal (n=62) segundo os padrões de resistência MDR, XDR e PDR.



Legenda: MDR (Multirresistência); XDR (Resistência extensiva); PDR (Panresistência)

Gráfico 10. Prevalência da resistência dos isolados de *E. coli* (n=248) a cada antibiótico estudado (ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, Imipenem, tetraciclina e trimetoprim+sulfametoxazol).

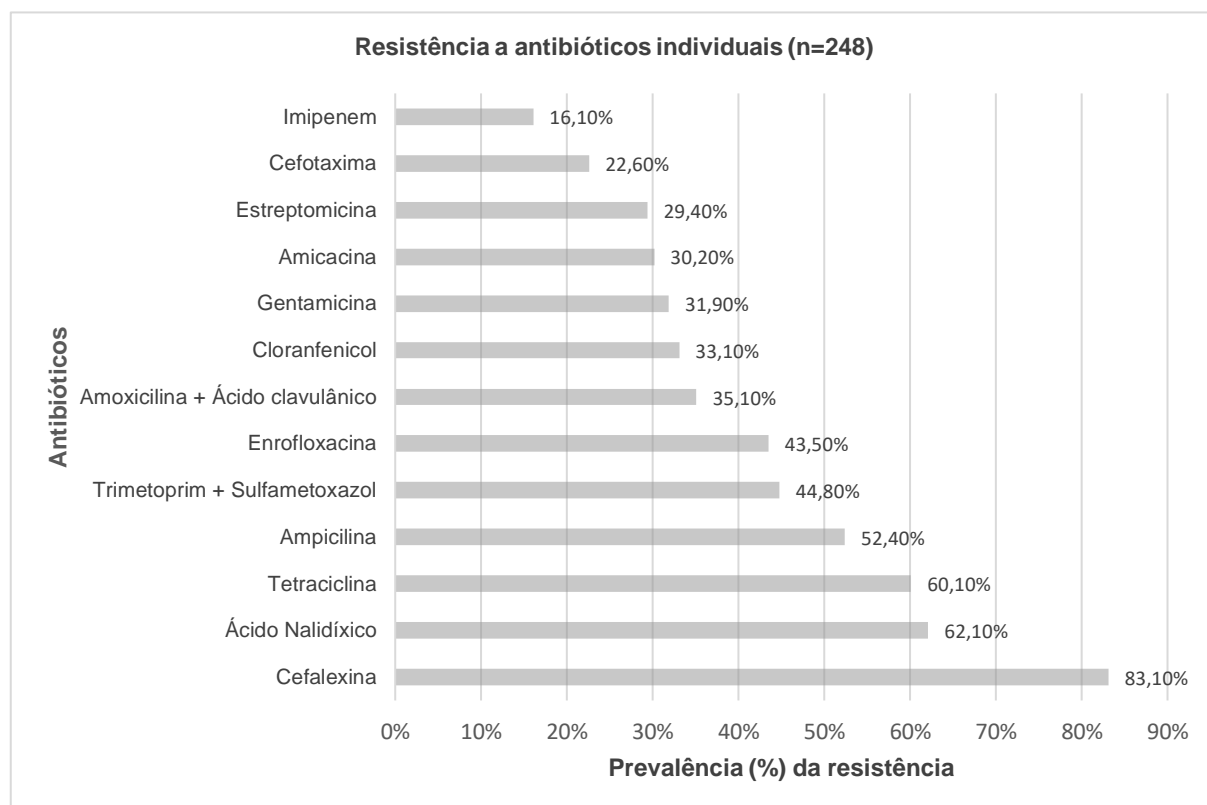
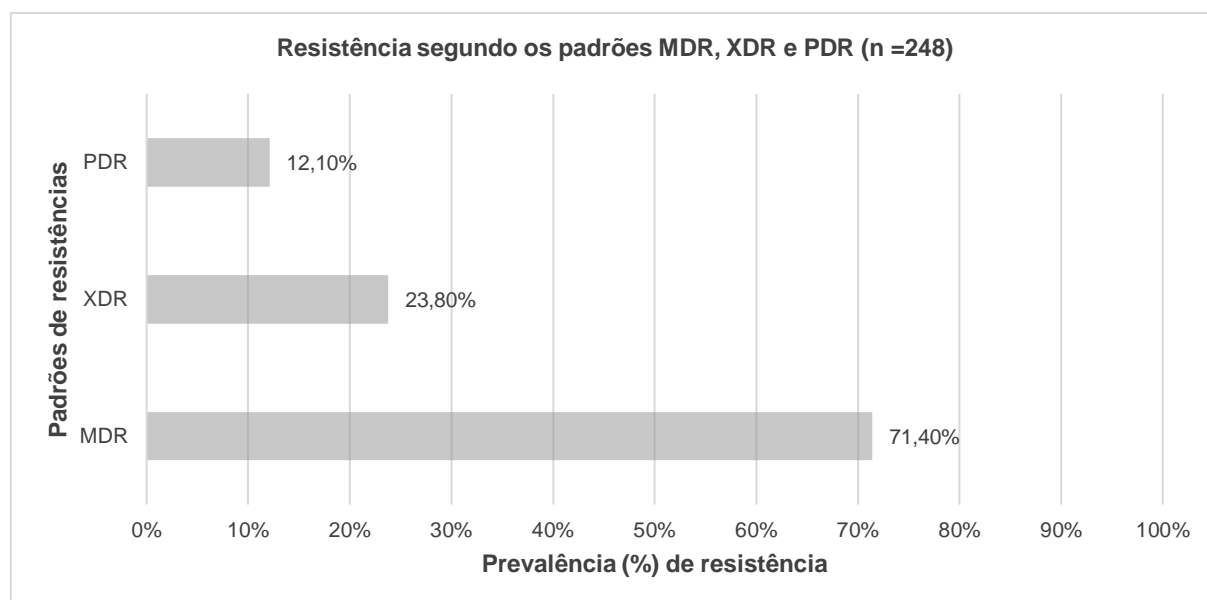


Gráfico 11. Prevalência da resistência dos isolados de *E. coli* (n=248) segundo os padrões de resistência MDR, XDR e PDR



Legenda: MDR (Multirresistência); XDR (Resistência extensiva); PDR (Panresistência)

Gráfico 12. Prevalência de perfis únicos de antibiorresistência relativamente aos isolados de *E. coli* agrupados por animal (n=62).

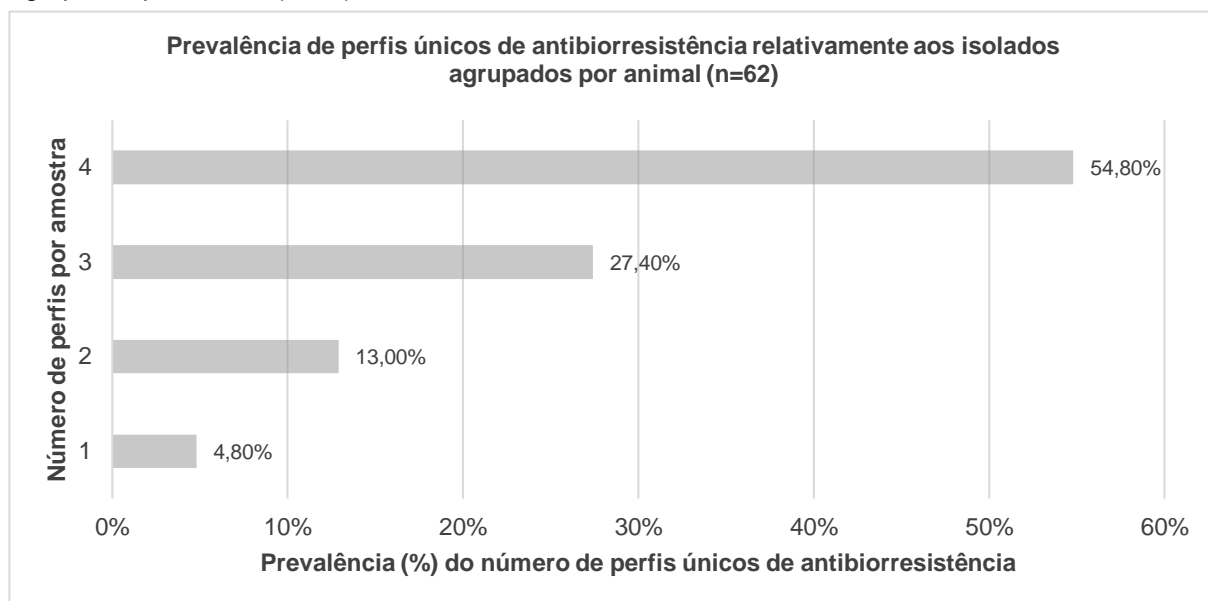
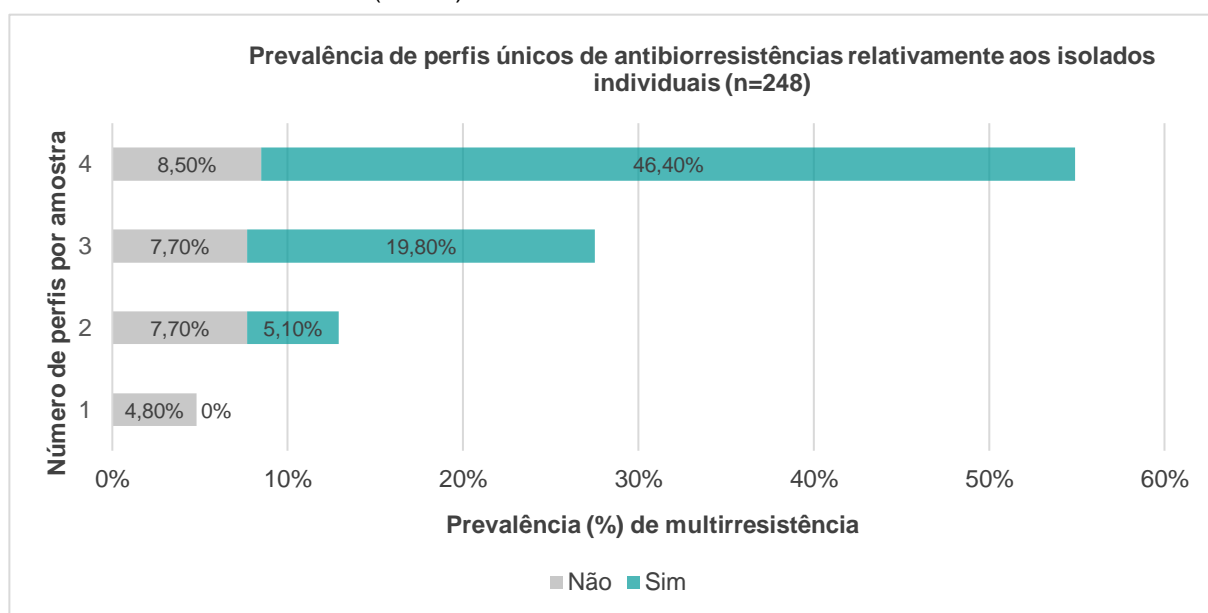


Gráfico 13. Prevalência da multirresistência nos perfis únicos de antibiorresistências relativamente aos isolados de *E. coli* individuais (n=248)



#### 4. Fatores de risco associados à ocorrência de antibiorresistência

##### 4.1. Ocorrência de pelo menos um isolado MDR, XDR e PDR por animal (n=62)

As variáveis incluídas no modelo saturado do GLM correspondem às variáveis com valor  $p$  inferior a 0,2 na análise univariada descrita anteriormente (anexo 3) e que após avaliação da correlação apresentaram maior sentido biológico. Tanto o modelo saturado como a regressão passo a passo (*stepwise regression*) dos modelos finais são apresentados na tabela 7.

No modelo saturado do padrão MDR foram incluídas as seguintes variáveis ( $p < 0,2$ ; e após correlação): IdadeEstrato, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt, PasseioTrela, AnimaisCoabitantes. No modelo saturado do padrão XDR foram incluídas as variáveis IdadeEstrato, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt, PasseioTrela, AcessoZeroExt, AnimaisCoabitantes, FreqMedVet, FreqHospDesdeAnimal e TutorAB. No modelo saturado do padrão PDR foram incluídas as variáveis Desparasitado, AcessoLivreExt, AcessoZeroExt, AcessoObjetos e FreqHospDesdeAnimal.

Para integrar o modelo final foram selecionadas as mesmas variáveis (AcessoLivreExt, FreqHospDesdeAnimal) para as categorias XDR e PDR, enquanto para a categoria MDR foram selecionadas as categorias Idade, AcessoLivreExt e PasseioTrela.

No padrão MDR a idade sénior ( $p=0,031$ ) e o acesso ao livre exterior ( $p=0,033$ ) foram positivamente associados com a multirresistência a antibióticos em isolados de *E. coli* provenientes de animais de companhia (tabela 8).

Nos padrões XDR e PDR a frequência do meio hospitalar de medicina humana pelo tutor desde que adquiriu o animal ( $p=0,004$ ;  $p=0,023$ , respetivamente) foi o único fator associado a resistência extensiva a antibióticos e panresistência (tabela 8).

Nenhuma associação foi encontrada para as restantes variáveis (animais coabitantes, guloseimas como suplemento à alimentação, nenhum tipo de acesso ao exterior, acesso ao exterior através de passeio à trela, frequência de visita ao veterinário, acesso aos objetos do tutor, consumo de antibióticos pelo tutor) relativamente a todos os padrões de resistência (MDR, XDR e PDR).

De acordo com o modelo, os cães sénior revelaram um risco significativamente menor de serem portadores de isolados de *E. coli* multirresistente aos antimicrobianos (OR 0,02 [0,00;0,71]), assim como os cães que têm acesso livre ao exterior (OR 0,07 [0,01;0,80]), isto é, não são indicados como fatores de risco relativamente a multirresistências. Cães cujo tutor frequentou o meio hospitalar de medicina humana desde que o adquiriu revelam também não ser um fator de risco de colonização por *E. coli* extensivamente resistente aos antimicrobianos (OR 0,14 [0,04-0,52]) e panresistente aos antimicrobianos (OR 0,14 [0,07;0,82]) (tabela 8).

É importante notar que, após análise estatística, as variáveis são significativamente associadas a uma menor probabilidade de os cães serem portadores de isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos. No total foram encontradas três variáveis que se associam a um menor risco de resistência nos cães (n=62): a idade, o acesso livre ao exterior e tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o seu cão.

Tabela 7. Comparação de modelos saturados da generalização linear de fatores de risco para os vários tipos de padrões de antibiorresistências observados nos isolados adquiridos por animal (n=62). Variáveis explanatórias incluídas: Idade, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), PasseioTrela, AcessoZeroExt (nenhum tipo de acesso ao exterior), AnimaisCoabitantes, FreqVet (frequência de visitas ao médico veterinário), FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal), TutorAB (exposição do tutor a antibioterapia prévia)

MDR	
Modelo	AIC
IdadeEstrato + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AnimaisCoabitantes	34,75
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AnimaisCoabitantes	32,80
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela	32,37
XDR	
Modelo	AIC
IdadeEstrato + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoZeroExt + AnimaisCoabitantes + FreqVet + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	86,15
IdadeEstrato + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoZeroExt + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	79,85
AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoZeroExt + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	76,25
AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoZeroExt + FreqHospDesdeAnimal	74,29
AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoZeroExt + FreqHospDesdAnimal	72,60
AcessoLivreExt + AcessoZeroExt + FreqHospDesdeAnimal	71,61
AcessoLivreExt + FreqHospDesdeAnimal	71,11
PDR	
Modelo	AIC
Desparasitado + AcessoLivreExt + AcessoZeroExt + AcessoObjetos + FreqHospDesdeAnimal	67,77
Desparasitado + AcessoLivreExt + AcessoZeroExt + FreqHospDesdeAnimal	65,77
Desparasitado + AcessoLivreExt + FreqHospDesdeAnimal	64,26
AcessoLivreExt + FreqHospDesdeAnimal	63,85

Legenda: MDR (Multirresistência); XDR (Resistência extensiva); PDR (Panresistência); AIC (*Akaike Information Criterion*)

Tabela 8. Modelos finais de generalização linear de fatores de risco para os vários tipos de padrões de antibiorresistências observados nos isolados agrupados por animal (n=62). As variáveis explanatórias incluídas são Idade Jovem, Idade Sênior, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), PasseioTrela e FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal).

	MDR			
Variáveis	Odds Ratio	OR 95% IC	Desvio Padrão	Valor p
Jovem	0,51	[0,045; 5,91]	0,64	0,592
Sênior	0,02	[0,00;0,71]	0,04	0,031*
AcessoLivreExt	0,07	[0,01;0,80]	0,08	0,033*
PasseioTrela	0,00	[0,00;-]	0,00	0,995
	XDR			
Variáveis	Odds Ratio	OR 95% IC	Desvio Padrão	Valor p
AcessoLivreExt	0,18	[0,02-1,54]	0,19	0,116
FreqHospDesdeAnimal	0,14	[0,04-0,52]	0,09	0,004*
	PDR			
Variáveis	Odds Ratio	OR 95% IC	Desvio Padrão	Valor p
AcessoLivreExt	0,00	[0,00;-]	0,00	0,992
FreqHospDesdeAnimal	0,23	[0,07;0,82]	0,15	0,023*

Legenda: \* valores de p significativos; OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); MDR (Multirresistência); XDR (Resistência extensiva); PDR (Panresistência)

#### 4.2. Resistência ao nível do isolado (n=248)

As variáveis incluídas no modelo saturado do GLMEM correspondem às variáveis com valor  $p$  inferior a 0,2 na análise univariada descrita anteriormente (anexo 4) e que após avaliação da correlação apresentaram maior sentido biológico. Tanto o modelo saturado como o processo manual regressivo e progressivo (*manual backward and forward regression*) dos modelos finais são apresentados na tabela 9.

No modelo saturado do padrão MDR foram incluídas as seguintes variáveis ( $p < 0,2$ ; e após correlação): IdadeEstrato, AlimentaçãoSeca, AlimentaçãoHúmida, AlimentaçãoCaseira, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt, PasseioTrela, AcessoCama, AcessoObjetos, InteraçãoLambeTutor, AnimaisCoabitantes, FreqHospDesdeAnimal e TutorAB. No modelo saturado do padrão XDR foram incluídas as variáveis: IdadeEstrato, AlimentaçãoHúmida, AlimentaçãoCaseira, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt, PasseioTrela, AcessoCama, AcessoObjetos, InteraçãoLambeTutor, AnimaisCoabitantes, FreqHospDesdeAnimal e TutorAB. No modelo saturado do padrão PDR foram incluídas as variáveis: IdadeEstrato, AlimentaçãoSeca, AlimentaçãoCaseira, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt, PasseioTrela, AcessoCama, AcessoObjetos, InteraçãoLambeTutor, AnimaisCoabitantes, FreqHospDesdeAnimal e TutorAB.

No padrão MDR o acesso ao exterior livre ( $p = 0,038$ ) foi a única variável positivamente associada com a multirresistência a antibióticos em isolados de *E. coli* provenientes de cães (tabela 10). Nos padrões XDR e PDR a frequência do meio hospitalar de medicina humana pelo tutor desde que adquiriu o animal ( $p = 0,017$ ;  $p = 0,040$ , respetivamente) foi o único fator associado, neste caso, a resistência extensiva a antibióticos e panresistência (tabela 10).

Nenhuma associação foi demonstrada para as restantes variáveis (animais coabitantes, guloseimas como suplemento à alimentação, nenhum tipo de acesso ao exterior, acesso ao exterior através de passeio à trela, frequência de visita ao veterinário, acesso aos objetos do tutor, consumo de antibióticos pelo tutor) em qualquer um dos padrões de resistência (MDR, XDR e PDR).

De acordo com o modelo, cães que têm acesso livre ao exterior revelam um risco significativamente menor de serem portadores de isolados de *E. coli* multirresistente aos antimicrobianos (OR 0,16 [0,03;0,90]). Cães cujo tutor frequentou o meio hospitalar de medicina humana desde que o adquiriu revelam um risco significativamente menor de colonização por *E. coli* extensivamente resistente aos antimicrobianos (OR 0,09 [0,01;0,65]) e panresistente aos antimicrobianos (OR 0,20 [0,05;0,90]) (tabela 10).

Após análise estatística, as variáveis são significativamente associadas a uma menor probabilidade de os cães serem portadores de isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos. No total foram encontradas duas variáveis que se associam a um menor risco de resistência nos cães (n=248): o acesso livre ao exterior e tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o seu cão.



Tabela 9. Comparação de modelos de fatores de risco de regressão logística mista simples para os vários tipos de padrões de antibiorresistências apresentados pelos isolados individualmente (n=248). Variáveis explanatórias incluídas: Idade, AlimentaçãoGuloseimas, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), PasseioTrela, AcessoZeroExt (nenhum tipo de acesso ao exterior), AnimaisCoabitantes, FreqVet (Frequência de visitas ao médico veterinário), FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal), TutorAB (exposição do tutor a antibioterapia prévia).

MDR	
Modelo	AIC
IdadeEstrato + AlimentaçãoSeca + AlimentaçãoHúmida + AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	238,8
IdadeEstrato+ AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	237,3
IdadeEstrato+ AlimentaçãoHúmida + AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	237,2
IdadeEstrato+ AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	235,5
AcessoLivreExt + PasseioTrela + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal +TUTORAB	235,5
IdadeEstrato+ AcessoLivreExt + PasseioTrela + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	234,9
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	233,4
IdadeEstrato+ AcessoLivreExt + PasseioTrela + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	232,9
IdadeEstrato+ AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	231,5
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	229,6
IdadeEstrato + PasseioTrela + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	228,9
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	227,8
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	227,1
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	225,9
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + TutorAB	225,2
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor	223,9
XDR	
Modelo	AIC
IdadeEstrato + AlimentaçãoHúmida + AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	226,7
IdadeEstrato+AlimentaçãoSeca+ AlimentaçãoHúmida+ AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	226,1
IdadeEstrato+ AlimentaçãoSeca + AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	224,2

Tabela 9 (continuação)

XDR	
Modelo	AIC
IdadeEstrato+ AlimentaçãoSeca + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	222,4
IdadeEstrato+ AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	222,2
AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	220,7
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal	220,4
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	219,3
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	217,4
IdadeEstrato + FreqHospDesdeAnimal	215,1
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	214,1
AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	212,9
AcessoLivreExt + FreqHospDesdeAnimal	211,4
PDR	
Modelo	AIC
IdadeEstrato+AlimentaçãoSeca+ AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	172,6
IdadeEstrato+ AlimentaçãoHúmida + AlimentaçãoCaseira + AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	171,8
IdadeEstrato+AlimentaçãoSeca+ AlimentaçãoGuloseimas + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	171,0
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal	167,5
AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + AnimaisCoabitantes + FreqHospDesdeAnimal + TutorAB	166,1
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + PasseioTrela + AcessoCama + AcessoObjetos + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	165,7
IdadeEstrato + FreqHospDesdeAnimal	164,6
IdadeEstrato + AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	161,2
AcessoLivreExt + InteraçãoLambeTutor + FreqHospDesdeAnimal	158,0
AcessoLivreExt + FreqHospDesdeAnimal	157,2

Legenda: MDR (Multirresistência); XDR (Resistência extensiva); PDR (Panresistência); AIC (*Akaike Information Criterion*)

Tabela 10. Modelos finais de fatores de risco de regressão logística mista simples para os vários tipos de padrões de antibiorresistências (MDR, XDR e PDR) apresentados pelos isolados individualmente (n=248). As variáveis explanatórias incluídas são Idade Jovem, Idade Sênior, AcessoLivreExt (acesso livre ao exterior), InteraçãoLambeTutor (Cão interage com tutor lambendo) e FreqHospDesdeAnimal (frequência do meio hospitalar humano por parte do tutor desde que adquiriu o animal).

	MDR			
Variáveis	Odds Ratio	OR 95% IC	Std. Error	Valor p
Jovem	4,45	[0,995;19,90]	0,76	0,050
Sênior	0,00	[0,00;-]	7883,89	0,998
AcessoLivreExt	0,16	[0,03;0,90]	0,89	0,038*
InteraçãoLambeTutor	0,00	[0,00;-]	7883,89	0,998
	XDR			
Variáveis	Odds Ratio	OR 95% IC	Std. Error	Valor p
AcessoLivreExt	0,08	[0,004;1,56]	1,53	0,095
FreqHospDesdeAnimal	0,09	[0,014;0,65]	0,98	0,017*
	PDR			
Variáveis	Odds Ratio	OR 95% IC	Std. Error	Valor p
AcessoLivreExt	0,00	[0,00;-]	1024,00	0,980
FreqHospDesdeAnimal	0,20	[0,05;0,90]	0,76	0,040*

Legenda: \* valores de p significativos; OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); MDR (Multirresistência); XDR (Resistência extensiva); PDR (Panresistência)

Depois da análise dos modelos finais foram encontradas três variáveis estatisticamente significativas no total: a idade (n=62), o acesso livre ao exterior (n=62; n=248) e tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o seu cão (n=62; n=248) (tabelas 8 e 10).

Depois de identificados os três fatores associados com os padrões de resistência a antimicrobianos (MDR, XDR e PDR) foi realizada uma nova análise multifatorial, com vista a avaliar a associação entre os fatores anteriormente descritos e cada antimicrobiano testado (tabela 11, anexo 5). Todos os antibióticos incluídos no estudo apresentaram algum tipo de associação estatisticamente significativa com algum dos três fatores anteriores.

A ampicilina, a amoxicilina associada ao ácido clavulânico e a enrofloxacin foram os antimicrobianos associados com todos os fatores analisados, nomeadamente a idade, o acesso livre ao exterior e tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o seu cão.

Os cães de idade jovem apresentaram uma maior probabilidade de serem portadores de isolados de *E. coli* resistentes ao ácido nalidíxico (OR 4,71 [1,03;1,56]), à ampicilina (OR 4,13 [1,13;15,18]), à amoxicilina associada ao ácido clavulânico (OR 3,90 [1,23;13,37]) e à enrofloxacin (OR 6,11 [1,76;21,18]).

Os cães de idade sénior apenas foram significativamente associados com a tetraciclina, apresentando um menor risco de colonização por *E. coli* resistente a este composto (OR 0,09 [0,01;0,72]).

O acesso livre ao exterior e os cães com tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o seu animal foram os fatores com o maior número de associações estatisticamente significativas relativamente a resistências aos antimicrobianos em estudo.

De acordo com a análise estatística, os cães com acesso livre ao exterior apresentaram um menor risco de ocorrência de *E. coli* resistente à amicacina, ampicilina, amoxicilina associado ao ácido clavulânico, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina e à tetraciclina.

Os cães com tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana apresentaram um menor risco de serem portadores de *E. coli* resistente à amicacina, à ampicilina, à amoxicilina associada ao ácido clavulânico, à cefotaxima, ao cloranfenicol, à enrofloxacina, à gentamicina, ao imipenem e ao trimetoprim associado ao sulfametoxazol.

Tabela 11. Resultados das associações entre as resistências individuais a cada antimicrobiano em estudo apresentados pelos isolados individualmente (n=248) e os potenciais fatores de risco determinados através da regressão logística mista.

Antimicrobiano	Fator de risco	Odds Ratio	OR 95% IC	Valor p
Ácido Nalidíxico	Idade jovem	4,71	[1,03;1,56]	0,046*
	Idade sénior	0,43	[0,07;2,76]	0,373
	Acesso livre exterior	0,27	[0,07;1,05]	0,059
	Tutor frequenta hospital medicina humana	0,43	[0,08;2,17]	0,304
Amicacina	Idade jovem	2,78	[0,89;8,61]	0,077
	Idade sénior	0,24	[0,03;2,49]	0,234
	Acesso livre exterior	0,26	[0,06;0,96]	0,043*
	Tutor frequenta hospital medicina humana	0,26	[0,07;0,92]	0,036*
Ampicilina	Idade jovem	4,13	[1,13;15,18]	0,033*
	Idade sénior	0,67	[0,11;4,17]	0,665
	Acesso livre exterior	0,19	[0,05;0,71]	0,014*
	Tutor frequenta hospital medicina humana	0,11	[0,01;0,94]	0,044*
Amoxicilina + Ácido clavulânico	Idade jovem	3,90	[1,23;13,37]	0,021*
	Idade sénior	0,30	[0,03;3,07]	0,310
	Acesso livre exterior	0,16	[0,04;0,66]	0,011*
	Tutor frequenta hospital medicina humana	0,17	[0,04;0,66]	0,011*
Cefalexina	Idade jovem	1,51	[0,00;-]	0,995
	Idade sénior	0,35	[0,04;2,87]	0,330
	Acesso livre exterior	0,14	[0,02;0,96]	0,046*
	Tutor frequenta hospital medicina humana	0,00	[0,00;-]	0,994

Tabela 11 (continuação)

Antimicrobiano	Fator de risco	Odds Ratio	OR 95% IC	Valor p
Cefotaxima	Idade jovem	2,60	[0,84;8,07]	0,098
	Idade sénior	0,37	[0,04;3,84]	0,406
	Acesso livre exterior	0,15	[0,03;0,74]	0,020*
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,22	[0,07;0,73]	0,013*
Cloranfenicol	Idade jovem	2,44	[0,79;7,50]	0,118
	Idade sénior	0,61	[0,09;4,14]	0,614
	Acesso livre exterior	0,16	[0,04;0,66]	0,011*
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,26	[0,07;0,92]	0,036*
Enrofloxacin	Idade jovem	6,11	[1,76;21,18]	0,004*
	Idade sénior	0,61	[0,09;4,14]	0,614
	Acesso livre exterior	0,23	[0,06;0,82]	0,023*
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,16	[0,03;0,80]	0,026*
Estreptomicina	Idade jovem	2,92	[0,94;9,10]	0,065
	Idade sénior	0,93	[0,14;6,40]	0,940
	Acesso livre exterior	0,23	[0,06;0,92]	0,038*
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,38	[0,12;1,20]	0,098
Gentamicina	Idade jovem	2,65	[0,86;6,16]	0,089
	Idade sénior	0,30	[0,03;3,07]	0,310
	Acesso livre exterior	0,21	[0,05;0,85]	0,029*
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,29	[0,09;0,96]	0,043*
Imipenem	Idade jovem	2,40	[0,72;8,02]	0,155
	Idade sénior	0,60	[0,06;6,44]	0,673
	Acesso livre exterior	0,00	[0,00;-]	0,992
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,21	[0,07;0,68]	0,009*
Tetraciclina	Idade jovem	3,00	[0,46;19,69]	0,252
	Idade sénior	0,09	[0,01;0,72]	0,023*
	Acesso livre exterior	0,14	[0,04;0,65]	0,012*
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,26	[0,03;2,29]	0,227
Trimetoprim + Sulfametoxazol	Idade jovem	1,88	[0,56;6,31]	0,304
	Idade sénior	0,27	[0,04;1,86]	0,183
	Acesso livre exterior	0,42	[0,12;1,49]	0,179
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,20	[0,04;0,97]	0,046*

Legenda: \* valores de *p* significativos; OR (*Odds Ratio*); IC (Intervalo de confiança)

## V. Discussão

Na área da saúde humana e animal a problemática da antibiorresistência tem sido um dos temas mais discutidos, atual e globalmente, tanto devido ao aumento do número de casos associados a bactérias multirresistentes como pela dificuldade de prevenir o aparecimento dessas mesmas resistências. Apesar da crescente preocupação, os estudos relacionados com a descrição de fatores de risco na área dos animais de companhia são ainda raros e, muitas vezes, focados apenas na aquisição de resistências antimicrobianas como consequência da utilização excessiva de antibióticos. Deste modo é importante identificar potenciais fatores de risco subjacentes às antibiorresistências, através de outro tipo de abordagem, focada na partilha de espaço/ ambiente doméstico e comunitário entre o animal e o ser humano.

A descrição da exposição prévia a antibioterapia pela população em estudo foi um dos pontos de interesse deste trabalho, de forma a detetar potenciais fatores de risco e de forma a verificar se a tendência da diminuição da utilização de antimicrobianos se observava no panorama nacional da medicina veterinária na área dos animais de companhia (EMA, 2017). De fato, os resultados confirmam esta tendência, uma vez que apenas 35,5% dos canídeos havia realizado antibioterapia prévia. Porém esta prevalência poderá não corresponder ao atual panorama nacional da utilização de antibióticos, dado que um dos principais fatores de inclusão neste estudo era o animal nunca ter realizado nenhum tipo de tratamento antimicrobiano até à data da recolha da amostra, o que pode ter influenciado a amostra no sentido de recolha do maior número de cães que correspondessem a esse critério.

De entre as situações médico-veterinárias para as quais foram prescritos antibióticos com maior regularidade, destacam-se a antibioterapia como medicação pós cirúrgica e a antibioterapia utilizada para o tratamento de otites (otite externa e otite media). A grande maioria destes tratamentos são tópicos e consistem numa combinação de antibióticos de largo espectro, agentes antifúngicos e agentes anti-inflamatórios, o que torna difícil a utilização de antibióticos de espectro estreito, sendo que a alternativa passa pela associação de soluções antimicrobianas de limpeza do canal auditivo (Spohr *et al.*, 2012).

Os cães de idade sénior foram o grupo no qual se registou a maior prevalência de antibioterapia prévia realizada, o que era expetável segundo o decurso clínico natural de um animal com a sua idade, pois à medida que o tempo passa o animal tem maior probabilidade de ter algum tipo de doença para a qual lhe é prescrito um fármaco, neste caso específico, um antibiótico (Epstein *et al.*, 2005). Assim, este é um fator de risco relacionado com tratamentos prévios com antibióticos.

Outro fator de risco para o qual se encontrou uma associação com a realização de antibioterapia prévia foi a esterilização. A esterilização é aconselhada desde cedo pelo médico veterinário como um procedimento de prevenção para muitas doenças relacionadas com os tratos urinário e reprodutivo, principalmente em fêmeas, e problemas comportamentais associados ao género (Bartges *et al.*, 2012). Apesar de a grande maioria das esterilizações não resultar em infeção são frequentemente prescritos antibióticos, mais especificamente a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, como medicação pós cirúrgica como estratégia de prevenção de uma possível infeção (Guardabassi, 2013; Spohr *et al.*, 2012).

O acesso ao exterior através do passeio à trela foi também identificado como um fator associado à realização de antibioterapia prévia, o que poderá dever-se tanto à exposição do animal a diversos agentes patogénicos presentes no meio ambiente (muitas vezes, através de vetores) que consequentemente poderão despoletar doença no cão posteriormente resolvida através de terapêutica antimicrobiana (Spohr *et al.*, 2012) ou, por outro lado, a um excesso de zelo por parte do tutor e/ ou médico veterinário, sendo nestes casos a terapêutica prescrita empiricamente. De facto, a vasta maioria dos veterinários concorda que os antibióticos têm um efeito terapêutico benéfico em cães com afeções difíceis de diagnosticar, cedendo à pressão imediata do tutor (Han *et al.*, 2016). Os cães que não têm qualquer tipo de acesso ao exterior são geralmente aqueles que nunca foram submetidos a nenhum tipo de tratamento antimicrobiano, correspondendo desta forma a animais muito jovens (<3-6 meses) com esquemas vacinais ainda incompletos e/ ou imunocomprometidos, características que não permitem o contato com o exterior sob pena de contraírem uma doença ou infeção (Bartges *et al.*, 2012; Ford *et al.*, 2017).

A frequência com que o cão visita o CAMV encontra-se também associada à realização de antibioterapia prévia pelo cão, mais especificamente a frequência anual (49,2%) e semestral (69,2%). Estas podem ser interpretadas como as únicas situações em que o cão é observado e diagnosticado pelo médico veterinário, consequência do progresso da medicina veterinária que levou ao aumento do número de animais de companhia tratados por profissionais especializados em clínica e cirurgia de animais de companhia, tendo como consequência o aumento da utilização de tratamentos antimicrobianos (Guardabassi, Schwarz, & Lloyd, 2004; Guardabassi & Prescott, 2015; Martins da Costa, Loureiro, & Matos, 2013).

Os resultados mostram ainda que cães com tutores que frequentam o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o animal, com tutores que já estiveram internados ou realizaram um procedimento cirúrgico e com tutores que já foram expostos a antibioterapia também se encontram associados a uma terapêutica antimicrobiana prévia. Estas associações podem ser explicadas pelo simples facto de o tutor submeter o seu animal a cuidados de saúde semelhantes aos seus, resultado de uma maior consciência do tutor para a saúde e bem-estar animal, contribuindo para o aumento da terapêutica com antimicrobianos,

sendo muitos deles comuns a ambas as espécies (Guardabassi *et al.*, 2004; Leite-Martins *et al.*, 2014). De acordo com Umber & Bender (2009) outra possível explicação para esta associação, está relacionada com o facto de animais com infeções para as quais é prescrita terapêutica antimicrobiana tenham, possivelmente, adquirido essa infeção a partir de tutores que tenham estado recentemente hospitalizados ou que frequentem o hospital de medicina humana devido a doença crónica ou por motivos profissionais. Esta hipótese é corroborada por outros estudos (Nienhoff *et al.*, 2009; Rutland *et al.*, 2009; Van Duijkeren *et al.*, 2004).

Quanto ao perfil de resistência de antimicrobianos apresentado pelos isolados em estudo, impõe-se a comparação com estudos internacionais e nacionais anteriores, sendo esta difícil de interpretar devido a diferenças no desenho do estudo, nos antibióticos testados, na aplicação de diferentes *breakpoints* e ainda devido a variações temporais, geográficas e socioeconómicas. Porém, neste trabalho, todos os antibióticos apresentaram prevalências de resistências antimicrobianas mais elevadas do que as reportadas em estudos anteriores (Ahmed *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2011; Leite-Martins *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2009; Saputra *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2015; Spohr *et al.*, 2012; Wedley *et al.*, 2017). A resistência dos isolados de *E. coli* à cefalexina surge como o tipo de resistência mais comum, seguida da resistência ao ácido nalidíxico, o que não está de acordo com estudos anteriores que referem a ampicilina e a tetraciclina como os antibióticos responsáveis pelo maior número de antibiorresistências; neste estudo são reportados como o quarto e terceiro tipo mais comuns de resistência apresentada pelos isolados de *E. coli*, respetivamente.

Isolados *Escherichia coli* MDR foram obtidos a partir de 71,4% dos cães em estudo, revelando uma prevalência bastante elevada comparativamente com outros estudos em animais de companhia (Saputra *et al.*, 2017; Trott *et al.*, 2004; Wedley *et al.*, 2017); no entanto, é também difícil comparar este resultado, dado que a definição de MDR difere entre estudos. *E. coli* multirresistente foi descrita como frequente em animais de companhia apresentados à consulta em centros veterinários de referência (Guardabassi & Prescott, 2015). Num estudo relativo a *Staphylococcus spp.* foram também registados elevados níveis de multirresistência em isolados obtidos de cães (93,2%), o que sugere uma tendência para o aumento de perfis MDR entre as bactérias isoladas de animais de companhia (Han *et al.*, 2016). Estas estirpes MDR são frequentemente resistentes a todos os antimicrobianos convencionais autorizados para o uso em medicina veterinária, o que se impõe como uma ameaça à saúde pública animal e humana, aumentando o risco de falha terapêutica e o recurso à eutanásia (Weese *et al.*, 2015). Existe uma preocupação significativa com a saúde pública, devido ao potencial risco de transmissão animal intra e inter espécies destas resistências, para além do potencial aumento da aplicação em medicina veterinária de antimicrobianos criticamente importantes, autorizados unicamente para uso humano, como é o caso dos carbapenemos (Grönthal *et al.*, 2018; Guardabassi, 2013; Guardabassi & Prescott, 2015).



O primeiro relatório da OMS em que foram divulgados dados de vigilância sobre resistência a antibióticos, apresentado em Janeiro de 2018, descreveu um aumento significativo dos níveis de resistência antimicrobiana tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (WHO, 2018), o que pode explicar os níveis elevados de resistência observados neste estudo, que seguem esta tendência verificada globalmente.

Segundo as categorias propostas pela EFSA (EFSA & ECDC, 2018), 92,30% dos antimicrobianos testados enquadravam-se nas categorias de prevalência de resistência extremamente alta, muito alta e alta (tabela 6).

Apesar de ser o único antibiótico na categoria de prevalência de resistência moderada, a categoria mais baixa onde foram enquadrados os antibióticos incluídos neste estudo, os resultados relativos ao imipenem surgem como uns dos mais preocupantes, uma vez que são considerados antimicrobianos de importância crítica em medicina humana (WHO, 2017). O seu uso é muito limitado em medicina veterinária, logo bactérias resistentes aos carbapenemos são raramente reportadas nesta área (Grönthal *et al.*, 2018), não existindo relatos relativos a cães sem qualquer tipo de exposição prévia a antibioterapia, como é o caso dos animais em estudo. Desta forma, o contato com outros animais (Han *et al.*, 2016) ou humanos com exposição prévia a antibioterapia (Cole & Rankin, n.d.; Johnson *et al.*, 2008), mesmo que esta não inclua os carbapenemos (Grönthal *et al.*, 2018), hábitos de coprofagia por parte do cão (Leite-Martins *et al.*, 2014) e interação com o meio ambiente (Adams *et al.*, 2018) podem justificar a aquisição de bactérias resistentes aos carbapenemos por animais nunca antes submetidos a terapêutica antimicrobiana.

Neste trabalho foram também encontradas elevadas taxas de isolados de *E. coli* XDR (23,80%) e PDR (12,10%), nunca antes reportadas em estudos relativos a caracterização de isolados de *E. coli* em animais de companhia. Os níveis de resistência a todos ou quase todos os antibióticos testados apresentado por isolados da família *Enterobacteriaceae* é altamente preocupante, como previamente reportado em estudos de medicina humana (Li *et al.*, 2012; Souli, Galani, & Giamarellou, 2008). Por exemplo, Li *et al.* (2012) realizaram um estudo no qual a proporção de isolados MDR foi significativamente maior do que a observada para isolados XDR e PDR. Tal pode ser explicado pelo facto de que os isolados pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* são frequentemente resistentes a um grande número de antimicrobianos, deixando apenas disponíveis alguns antimicrobianos eficazes para o tratamento de infeções relacionadas, o que a longo prazo pode levar ao desenvolvimento de resistências a esses antimicrobianos (Li *et al.*, 2012). Consequentemente, a aplicação de uma terapêutica antimicrobiana de sucesso será cada vez mais difícil, dado que cada vez existirão menos antimicrobianos eficazes para o tratamento de doenças promovidas por essas espécies altamente resistentes a qualquer antimicrobiano (Li *et al.*, 2012; Souli *et al.*, 2008).

Nos 62 animais estudados foram ainda identificados, após análise estatística, quatro perfis únicos de antibiorresistência, o que se relaciona com a diferente suscetibilidade aos antibióticos testados apresentada pelos quatro isolados obtidos a partir de cada amostra, sendo assim possível inferir que os isolados testados correspondiam a diferentes estirpes de *E. coli*. Mais de metade dos cães em estudo (54,80%) eram portadores assintomáticos de quatro estirpes de *E. coli* com perfis de suscetibilidade antimicrobiana diferentes. Apesar das estirpes bacterianas apresentarem geralmente especificidade para o seu hospedeiro (Hao *et al.*, 2016), a identificação de estirpes diferentes de *E. coli* a partir de cada animal em estudo é um motivo de preocupação, devido ao seu potencial para expressarem diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, especialmente aos carbapenemos (Higgins *et al.*, 2010, Perez *et al.*, 2010, citados por Pomba *et al.*, 2016). Foi ainda identificada uma percentagem de multirresistência antimicrobiana mais elevada (46,40%) nos animais cujos isolados apresentavam quatro perfis únicos de antibiorresistência, ou seja, com quatro estirpes diferentes por animal. Desta forma, o animal pode ser considerado um possível portador assintomático de diferentes estirpes de *E. coli* portadoras de vários mecanismos de resistências à vasta maioria das classes de antimicrobianos geralmente associadas ao tratamento de infeções graves (Collignon, 2015). Por outro lado os isolados obtidos a partir de animais com um tipo único de perfil de resistência (4,80%), correspondendo provavelmente a estirpes idênticas, não apresentavam perfil de multirresistência, ou seja, apresentaram uma maior probabilidade de serem suscetíveis a vários compostos antimicrobianos pertencentes a diferentes classes (gráfico 13). Tais resultados sugerem que quanto maior for a variedade de estirpes de *E. coli* que existem num determinado animal, maior será a possibilidade de este ser portador de estirpes resistentes e eventual desenvolvimento de multirresistência antimicrobiana.

Quanto à identificação dos fatores de risco associados à ocorrência de antibiorresistências nos canídeos em estudo foram selecionados três potenciais fatores de risco: a idade, o acesso livre ao exterior e cães com tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o animal.

Neste trabalho, os isolados de *E. coli* provenientes de cães jovens apresentaram perfis com resistência antimicrobiana mais elevada do que os isolados provenientes de cães sénior. Estes últimos apresentaram um menor risco de serem portadores de *E. coli* multirresistentes (OR 0,02 [0,00;0,71]), enquanto os cães mais jovens apresentaram um maior risco de serem portadores de *E. coli* resistente ao ácido nalidíxico (OR 4,71 [1,03;1,56]), à ampicilina (OR 4,13 [1,13;15,18]), à amoxicilina associada ao ácido clavulânico (OR 3,90 [1,23;13,37]) e à enrofloxacina (OR 6,11 [1,76;21,18]). Existem estudos em animais de produção, como o de Khachatryan *et al.* (2004), que comprovam que animais mais jovens são portadores de uma microbiota intestinal mais resistente a antimicrobianos comparativamente à de animais mais velhos.

Pelo contrário, um estudo realizado por Rantala *et al.* (2004) demonstrou que cães mais velhos eram portadores de isolados de *E. coli* com perfil de resistência mais elevado quando comparados com os de cães mais jovens. O mesmo foi observado por Leite-Martins *et al.* (2014), que demonstraram que cães mais jovens e saudáveis eram portadores de estirpes de *E. coli* menos resistentes, possivelmente devido à menor oportunidade de contato com antimicrobianos.

No entanto, várias hipóteses podem explicar a associação encontrada neste estudo entre a idade e o desenvolvimento de resistências antimicrobianas. A composição da microbiota intestinal canina sofre modificações ao longo da vida do cão (Masuoka *et al.*, 2017), o que explica que o tipo de bactérias intestinais seja diferente consoante a idade, assim como a sua capacidade de desenvolver resistência a antimicrobianos, estando os animais mais jovens mais suscetíveis de serem colonizados por um número maior de bactérias resistentes a antimicrobianos. Em medicina humana foi já reportado em vários estudos (Barraud *et al.*, 2018; de Vries *et al.*, 2011; Pärnänen *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2011) que o desenvolvimento inicial de estirpes antibiorresistentes na microbiota intestinal humana é independente da exposição dos neonatos a antibióticos, mas muito provavelmente dependente da exposição a bactérias de origem materna e ambiental durante e após o parto, sendo que estas bactérias antibiorresistentes são significativamente amplificadas no hospedeiro mesmo na ausência da pressão seletiva antibiótica (Zhang *et al.*, 2011). Além disso, as resistências maternas adquiridas como consequência do consumo prévio de antibiótico podem ser herdadas através da transmissão de genes de resistência (Pärnänen *et al.*, 2018). O intestino é colonizado por bactérias gram-negativas maioritariamente após o nascimento e durante os primeiros dias de vida (Masuoka *et al.*, 2017; Mulder *et al.*, 2009; Pärnänen *et al.*, 2018), observando-se que o mecónio, que deveria ser estéril, apresenta-se colonizado por bactérias em alguns neonatos (Pärnänen *et al.*, 2018). Como foi dito anteriormente, a administração de antibióticos durante o parto está altamente relacionada com a seleção de bactérias antibiorresistentes, mais especificamente de bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes à amoxicilina (Barraud *et al.*, 2018). Assim, fazendo um paralelismo entre os humanos e os animais, o fator materno pode ser um fator explicativo para a presença de bactérias antibiorresistentes em cães mais jovens nunca expostos a antimicrobianos.

Acresce ainda que a resistência bacteriana está frequentemente associada à redução da aptidão bacteriana (*bacterial fitness*), tendo sido proposto que uma diminuição no uso de antibióticos (e, portanto, na pressão seletiva para adquirir resistência) beneficiaria as bactérias mais aptas e suscetíveis, permitindo que estas fossem substituindo as estirpes resistentes ao longo do tempo (Andersson & Hughes, 2010). Este facto pode explicar que cães mais velhos que nunca tenham sido expostos a terapêutica antimicrobiana prévia, apresentem um menor risco de serem portadores de bactérias resistentes a antibióticos.

De facto, mesmo tendo adquirido bactérias resistentes através do fator materno, estas teriam sido ultrapassadas em número por bactérias mais aptas e suscetíveis ao longo do tempo; esta reversão é lenta (Andersson & Hughes, 2010), influenciada pela não exposição a terapêutica antimicrobiana (diminuição da pressão seletiva) e por alterações na microbiota intestinal canina (Bischoff, 2016; Masuoka *et al.*, 2017).

Os cães com acesso livre ao exterior apresentaram também um menor risco (OR 0,16 [0,03;0,90]) de serem portadores de *E. coli* multirresistente.

Para além de um estudo de Leite-Martins *et al.* (2014) em que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre cães *indoor* e cães *outdoor* relativamente ao risco de contaminação com *E. coli* multirresistente, não foram encontrados outros trabalhos relativos à avaliação da associação entre o tipo de acesso que o animal doméstico tem ao exterior e a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos. Neste estudo, foram considerados como animais com acesso livre ao exterior os cães que podiam entrar e sair quando quisessem da casa para um jardim ou varanda, isto é, apesar de permanecerem num ambiente controlado pelos seus tutores, continuariam a ser expostos a um maior número de agentes microbianos comparativamente aos cães com acesso limitado ao exterior. Outros estudos tanto, de medicina humana (Ege *et al.*, 2011) como de medicina veterinária (Mulder *et al.*, 2009, 2011), defendem que a exposição a fatores ambientais, em particular a microrganismos, influenciam a expressão de um grande número de genes relacionados com o sistema imunológico. No entanto, os efeitos homeostáticos da colonização microbiana *outdoor* requerem uma exposição microbiana sustentada durante o desenvolvimento do animal. O desenvolvimento da microbiota intestinal em ambientes altamente higienizados afeta negativamente a sucessão normal do microbioma intestinal e promove a ativação da imunidade inata, o que pode prejudicar a homeostase imune, predispondo o animal a estirpes bacterianas com maior potencial de resistência a antibióticos (Ege *et al.*, 2011; Mulder *et al.*, 2011).

Os cães com tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana apresentaram um menor risco de serem portadores de *E. coli* extensivamente resistentes (OR 0,09 (0,01;0,65)) e panresistentes (OR 0,20 (0,05;0,90)). Mais especificamente, estes cães apresentaram um menor risco para colonização por isolados resistentes à amicacina, à ampicilina, à amoxicilina associado ao ácido clavulânico, à cefotaxima, ao cloranfenicol, à enrofloxacina, à gentamicina, ao imipenem e ao trimetoprim associado ao sulfametoxazol. Todos estes antibióticos são utilizados frequentemente em medicina humana, com exceção da enrofloxacina, que é de uso exclusivo médico veterinário (WHO, 2017). Até à data, foram reportados estudos que relacionaram a frequência de visitas do tutor a meios hospitalares de medicina humana, seja como profissional de saúde ou como doente, com o elevado risco de aquisição de bactérias resistentes a antimicrobianos (Leite-Martins *et al.*, 2014; Marks, Rankin, Byrne, & Weese, 2011); neste estudo, porém apenas os isolados de *E. coli*

extensivamente resistentes e panresistentes foram associados a um menor risco de aquisição através da exposição dos tutores ao meio hospitalar de medicina humana.

As estirpes com perfil de multirresistência a antimicrobianos (resistência a pelo menos três antimicrobianos pertencentes a diferentes classes) continuam a ser as mais frequentemente observadas em animais de companhia e em humanos, comparativamente a estirpes com perfil de resistência extensiva (apenas não suscetível a 1 ou 2 antimicrobianos) ou de panresistência (não suscetível a todos os antimicrobianos) (Barie, 2012; Eltai *et al.*, 2018; Grönthal *et al.*, 2018; Jackson *et al.*, 2015; Prescott & Boerlin, 2016; Schmidt *et al.*, 2015; Stenske *et al.*, 2009; Ventola, 2015); logo a partir destes estudos é possível inferir que o risco de ser portador de uma bactéria resistente a todos ou quase todos os antimicrobianos ainda é menor do que o risco de ser portador de uma bactéria resistente a pelo menos 3 antimicrobianos pertencentes a diferentes classes, tal como observado neste estudo. Este fenómeno pode ser explicado pelo uso excessivo e erróneo das classes de antimicrobianos mais comuns (penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, macrólidos, quinolonas e sulfonamidas associadas ao trimetoprim), tanto a nível hospitalar como a nível comunitário, que durante décadas contribuiu para um aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes a nível mundial, tanto em medicina humana como em medicina veterinária (Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA), 2017). Desta forma, tal como a taxa de mutação e a capacidade de aquisição de determinantes de resistência varia com a espécie bacteriana, também uns antibióticos induzem o desenvolvimento de resistências uns mais rapidamente do que outros (Coates, Halls, & Hu, 2011). Porém, a utilização de classes de antimicrobianos como os carbapenemos, cefalosporinas de última geração e polimixinas, foi mais criteriosa e não tão frequente, consequência do seu potencial como antimicrobianos de última linha, tendo sido recentemente definidos como antimicrobianos da mais alta prioridade entre os criticamente importantes para a medicina humana (ECDCI, 2017a), para os quais ainda não existem reportados muitos casos associados a resistências (Abraham, Wong, Turnidge, Johnson, & Trott, 2014; Grönthal *et al.*, 2018; Saputra *et al.*, 2017).

De forma a colmatar o complexo problema da disseminação de resistências antimicrobianas, considerado uma das maiores ameaças à saúde pública atualmente, a OMS, o ECDC e o Programa Nacional de Prevenção e Controlo de Infecções e Resistências aos Antimicrobianos (PPCIRA) têm vindo a desenvolver programas e ações no sentido de aumentar a racionalidade na utilização destes medicamentos (Coates *et al.*, 2011; Infarmed, 2014). Em medicina humana a maior parte dos países têm vindo a implementar a nível hospitalar, programas de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*) (Edwards & Gould, 2012; ECDC, 2017a; Holmes *et al.*, 2016; PPCIRA, 2017). Estes programas têm como base uma estratégia multimodal de promoção das precauções básicas de controlo de infeção que traduzem regras de boas práticas que

devem ser adotadas por todos os profissionais na prestação de cuidados de saúde, tendo em vista minimizar o risco de infeção e a transmissão cruzada, incidindo sobre dez padrões de qualidade (avaliação individual do risco de infeção na admissão e isolamento do utente; higiene das mãos; etiqueta respiratória; utilização de equipamento de proteção individual; descontaminação do equipamento clínico; controlo ambiental e descontaminação adequada das superfícies; manuseamento seguro da roupa; gestão adequada dos resíduos; práticas seguras na preparação e administração de injetáveis; prevenção da exposição a agentes microbianos no local de trabalho) (ECDC, 2017a; PPCIRA, 2017).

A higiene das mãos por parte dos profissionais foi descrita como a medida mais eficaz, mais simples e mais económica de prevenir qualquer infeção (Bebell & Muiru, 2014; PPCIRA, 2017), tendo sido descrito num estudo em medicina veterinária que tutores com bons hábitos de higienização, especialmente das mãos, apresentavam um menor risco de ser portadores de isolados de *E. coli* resistentes ao cloranfenicol, ácido nalidíxico e ciprofloxacina, congénere em medicina humana da enrofloxacina (Stenske *et al.*, 2009).

O consumo global de antibióticos em Portugal tem-se mantido abaixo da média da União Europeia, quer na comunidade, quer nos hospitais, tendo-se mesmo verificado uma diminuição do consumo de várias classes de antimicrobianos entre os anos de 2011-2016, com especial destaque os carbapenemos e quinolonas (PPCIRA, 2017).

A experiência de alguns países da Europa demonstra que a redução na prescrição de antibióticos resulta numa redução concomitante do isolamento de estirpes resistentes aos antibióticos (Infarmed, 2014). Assim, a implementação de programas de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos estabelecem uma utilização racional e adequada de antibióticos nos cuidados de saúde primários (que representam entre 80% a 90% de todas as prescrições de antibióticos) podendo ser um fator explicativo para o menor risco de resistências associadas a antibióticos frequentemente utilizados em medicina humana (Bebell & Muiru, 2014; Prescott & Boerlin, 2016) como a amicacina, a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, à cefotaxima, ao cloranfenicol, à gentamicina, ao imipenem e ao trimetoprim associado ao sulfametoxazol (Infarmed, 2014) verificadas neste estudo.

A enrofloxacina foi também um dos antibióticos para o qual os isolados de *E. coli* dos cães com tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana, apresentaram menor risco de resistência. Neste caso, como a enrofloxacina foi descrita como um medicamento de uso exclusivo veterinário (WHO, 2017), o menor risco associado à frequência de meios hospitalares de medicina humana por parte do tutor poderá estar relacionado com a não utilização deste antibiótico nesse mesmo meio, tendo sido utilizado como antibiótico controlo a este nível.

A amoxicilina associada ao ácido clavulânico, para além de ter sido o antibiótico mais consumido no meio hospitalar, foi também o mais consumido no meio ambulatorio (Infarmed, 2014) que não é abrangido, diretamente, pelas normas de programas de prevenção e controlo

de infecções e de resistência aos antimicrobianos instituídas em hospitais. Porém, estudos mostram que a satisfação dos doentes relativamente aos cuidados de saúde primários é mais dependente de uma comunicação eficaz do que da prescrição de um antibiótico, isto é, o parecer profissional do médico tem um impacto sobre a perceção e a atitude do doente em relação à sua doença e na perceção da necessidade e no modo de tomar antibióticos (Coxeter, Mar, & Hoffmann, 2017; M. Davis *et al.*, 2017). Logo, o doente comunitário, apesar de ter continuado a consumir frequentemente antibióticos, tem vindo a melhor compreender a correta posologia do mesmo, não os utilizando de forma errada.

### **5.1. Limitações do estudo**

Uma das limitações do estudo está relacionada com o número reduzido de cães envolvidos. Este número não foi calculado previamente, uma vez que o objetivo era incluir o maior número de animais possível, tendo em conta a reduzida disponibilidade temporal e financeira inerentes a um estudo de dissertação de mestrado.

Outra limitação está relacionada com a exclusão de 29 amostras fecais por não ter sido possível isolar *E. coli* a partir dessas amostras. Este resultado pode ser devido a falhas na recolha de amostra pelo médico veterinário durante a consulta ou com a composição geral da microbiota intestinal do cão no momento da recolha da amostra retal. Embora se pudesse ter realizado uma técnica de avaliação baseada na amplificação do ADN, como por exemplo por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para aumentar as hipóteses de deteção de *Escherichia coli*, esta metodologia não foi escolhida, uma vez que este estudo não dispensava a obtenção de isolados após cultura bacteriana.

É ainda importante referir a escassa disponibilidade de estudos relacionados com a prevalência do consumo de antibióticos e da prevalência de estirpes resistentes a antibióticos em animais de companhia, bem como de estudos relacionados com fatores de risco associados à ocorrência de bactérias resistentes em animais de companhia que nunca foram expostos a qualquer tipo de terapêutica antimicrobiana, o que compromete a comparação deste estudo com outros previamente realizados.

### **5.2. Perspetivas futuras**

Como perspetivas futuras, seria interessante alargar a amostra testada, aumentando o número absoluto de animais a incluir no estudo, assim com o número de espécies animais, incluindo outros animais de companhia como os felinos. Estes detêm características diferentes dos canídeos que poderiam ser estudadas e relacionadas com as resistências antimicrobianas, tal como observado por Leite-Martins *et al.* (2014). Seria também interessante diversificar a amostra, tanto ao nível de locais de recolha da amostra como ao nível de microrganismos analisados/ identificados, incluindo outros antimicrobianos clinicamente importantes em medicina humana e veterinária.

Seria também interessante realizar a sequenciação total do genoma dos isolados obtidos neste estudo, com o objetivo de caracterizar o microbioma intestinal dos vários canídeos consoante a idade, tal como realizado por Masuoka *et al.* (2017). Neste estudo os autores concluíram, que a microbiota intestinal dos canídeos sofre alterações consoante a idade, identificando as bactérias mais frequentemente encontradas em cada fase da vida do cão. Assim, em adição a este estudo poder-se-ia identificar quais os tipos de resistências mais frequentes consoante a idade do cão.

De forma a confirmar os resultados obtidos seria interessante avaliar tanto a associação entre o tipo de acesso que os cães têm ao exterior, *indoor* ou *outdoor* e o desenvolvimento de antibiorresistências, assim como a associação entre animais com tutores com profissões estritamente relacionadas com o meio hospitalar de medicina humana e o desenvolvimento de antibiorresistências.

Como já descrito anteriormente, a medicina humana tem implementado no seu meio hospitalar programas de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*), pelo que seria do interesse da comunidade veterinária, como descrito anteriormente por vários autores (Currie *et al.*, 2018; Edwards & Gould, 2012; Guardabassi & Prescott, 2015; Prescott & Boerlin, 2016), perceber quais são os fatores de risco que estão mais relacionados com a ocorrência de antibiorresistências em meio hospitalar e que não estão relacionados com a utilização excessiva de antibióticos nem com o período de hospitalização do animal; por exemplo, seria importante avaliar o impacto a nível hospitalar de medidas de higiene coletivas e individuais (instalações, pessoal e utentes) na dispersão de bactérias resistentes a antibióticos.



## VI. Conclusão

O presente estudo permite concluir que os cães de idade jovem apresentavam um maior risco de serem portadores de isolados de *E. coli* resistentes aos antibióticos estudados relativamente aos cães sénior, o que não é consentâneo com alguns estudos publicados na área de animais de companhia. Porém, a transmissão de resistências através do fator materno e a constante modificação da composição da microbiota intestinal podem ser fatores explicativos de estirpes resistentes encontradas em cães mais jovens e da sua eventual perda até à idade sénior.

Acrescem ainda dois fatores aos quais foi associado um menor risco de ser portador de isolados de *E. coli* resistentes aos antibióticos estudados: o acesso livre ao exterior e tutores com frequência regular ao meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o seu cão. Estudos prévios em medicina veterinária disponíveis relativos a estes dois fatores são muito escassos.

A exposição a fatores ambientais, em particular a agentes microbianos, é um dos fatores que sustenta que cães com acesso livre ao exterior estejam mais protegidos relativamente a bactérias resistentes a antibióticos.

Os tutores que frequentaram o meio hospitalar de medicina humana desde que adquiriram o animal, quer sejam profissionais de saúde ou apenas doentes, poderão ter beneficiado das estratégias e normas implementadas pelos programas de *antimicrobial stewardship* que resultaram numa diminuição ou mesmo regressão das espécies resistentes a certos antimicrobianos anteriormente observadas no meio hospitalar de medicina humana, contribuindo para o menor risco que cães com estes tutores têm de ser portadores de isolados de *E. coli* extensivamente resistentes e panresistentes a antibióticos devido à transmissão de resistências por contato humano-animal.

Por fim, é importante concluir que o menor risco associado à transmissão de bactérias XDR e PDR de humanos para animais não deve ser interpretada como um indicador de que a influência do contato do ser humano com antibióticos é menor do que a influência do animal, mas como um indicador da complexidade da temática, em que a necessidade de uma abordagem “Uma Só Saúde” em que todos contribuam para a resolução do problema é essencial.

## Bibliografia

- Abraham, S., Wong, H. S., Turnidge, J., Johnson, J. R. & Trott, D. J. (2014). Carbapenemase-producing bacteria in companion animals: a public health concern on the horizon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1155–1157. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt518>
- Acar, J. F. & Moulin, G. (2012). Antimicrobial resistance : a complex issue Pre-existence of antimicrobial resistance determinants Origin of antimicrobial resistance determinants. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 23–31.
- Acar, J. F., Moulin, G., Page, S. W. & Pastoret, P. P. (2012). Antimicrobial resistance in animal and public health: introduction and classification of antimicrobial agents. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 15–21. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2093>
- Access to Medicine Foundation. (2018). *First independent assessment of pharmaceutical company action on AMR Antimicrobial Resistance Benchmark 2018*. Disponível em [www.accesstomedicineindex.org](http://www.accesstomedicineindex.org)
- Adams, R. J., Kim, S. S., Mollenkopf, D. F., Mathys, D. A., Schuenemann, G. M., Daniels, J. B. & Wittum, T. E. (2018). Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae recovered from companion animal and livestock environments. *Zoonoses and Public Health*, 65(5), 519–527. <https://doi.org/10.1111/zph.12462>
- Ahmed, L. N., Price, L. B. & Graham, J. P. (2015). An exploratory study of dog park visits as a risk factor for exposure to drug-resistant extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) Public Health. *BMC Research Notes*, 8(1), 8–10. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1103-2>
- Allen, S. E., Boerlin, P., Janecko, N., Lumsden, J. S., Barker, I. K., Pearl, D. L. & Jardine, C. (2011). Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 882–888. <https://doi.org/10.1128/AEM.01111-10>
- Andersson, D. I. & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., Topp, E. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993–1001. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206316>
- Barie, P. S. (2012). Multidrug-Resistant Organisms and Antibiotic Management. *Surgical Clinics of North America*, 92(2), 345–391. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2012.01.015>
- Barraud, O., Peyre, M., Couvé-Deacon, E., Chainier, D., Bahans, C., Guignonis, V. & Garnier, F. (2018). Antibiotic Resistance Acquisition in the First Week of Life. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01467>
- Bartges, J., Boynton, B., Vogt, A. H., Krauter, E., Lambrecht, K., Svec, R. & Thompson, S. (2012). AAHA Canine Life Stage Guidelines. *AAHA American Animal Hospital Association; AVMA*. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-4009>

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Haubo, R., Christensen, B. & Green, P. (2018). *Package "lme4."* Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>
- Bebell, L. M. & Muiru, A. N. (2014). Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? *Global Heart*, 9(3), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2014.08.009>
- Belas, A., Salazar, A. S., Gama, L. T. da, Couto, N. & Pomba, C. (2014). Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in dogs. *The Veterinary Record*, 175(8), 202. <https://doi.org/10.1136/vr.101978>
- Belmar-Liberato, R., Gonzalez-Canga, A., Tamame-Martin, P. & Escribano-Salazar, M. (2011). Amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid resistance in veterinary medicine - The situation in Europe: A review. *Veterinarni Medicina*.
- Bischoff, S. C. (2016). Microbiota and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(1), 26–30. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000242>
- Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529(7586), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>
- British Small Animal Veterinary Association. (2017). Antibacterial use in companion animals. Acedido em Set 27, 2018. Disponível em: <https://www.bsava.com/Resources/Veterinary-resources/PROTECT/Antibacterial-use-in-companion-animals>
- Cantón, R. & Morosini, M. I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 977–991. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Antibiotic/Antimicrobial Resistance. Acedido Out 6, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Center for Disease Dynamics, Economics and Policy. (2016). *Antibiotic Use and Resistance in Food Animals - Current Policy and Recommendations*. Washington, DC, USA. Acedido Out 6, 2018. Disponível em: [https://www.cddep.org/wp-content/uploads/2017/06/india\\_abx\\_report-2.pdf](https://www.cddep.org/wp-content/uploads/2017/06/india_abx_report-2.pdf)
- Clinical Laboratory and Standards Institute. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved standard- Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25*. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI, Wayne, PA, USA. Disponível em: <http://shopping.netsuite.com/s.nl/c.1253739/it.A/id.1684/f>
- Clinical Laboratory and Standards Institute. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard - Fifth Edition VET01-S2*. CLSI, Wayne, PA, USA. Retrieved from [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
- Coates, A. R., Halls, G. & Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
- Cole, S. & Rankin, S. (n.d.). Pets and antimicrobial resistant bacteria. *Penn Vet*, 1475.

- Collignon, P. (2012a). Clinical impact of antimicrobial resistance in humans. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 221–230. <https://doi.org/10.1038/nature/10388>;
- Collignon, P. (2012b). The Importance of a One Health Approach to Preventing the Development and Spread of Antibiotic Resistance. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 366, pp. 23–27). [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_224](https://doi.org/10.1007/82_2012_224)
- Collignon, P. (2015). Antibiotic resistance: are we all doomed? *Internal Medicine Journal*, 45(11), 1109–1115. <https://doi.org/10.1111/imj.12902>
- Collineau, L., Belloc, C., Stärk, K., Hémonic, A., Postma, M., Dewulf, J. & Chauvin, C. (2017). Guidance on the Selection of Appropriate Indicators for Quantification of Antimicrobial Usage in Humans and Animals. *Zoonoses and Public Health*, 64(3), 165–184. <https://doi.org/10.1111/zph.12298>
- Coxeter, P. D., Mar, C. Del & Hoffmann, T. C. (2017). Parents' Expectations and Experiences of Antibiotics for Acute Respiratory Infections in Primary Care. *Annals of Family Medicine*, 15(2), 149–154. <https://doi.org/10.1370/afm.2040>
- Currie, K., King, C., Nuttall, T., Smith, M., & Flowers, P. (2018). Expert consensus regarding drivers of antimicrobial stewardship in companion animal veterinary practice: a Delphi study. *The Veterinary Record*, 182(24), 691. <https://doi.org/10.1136/vr.104639>
- Davis, J. A., Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Barrett, J. B., Brousse, J. H., Gustafson, J. & Kucher, M. (2011). Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from healthy companion animals. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 597–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04920.x>
- Davis, M., Liu, T.L., Taylor, Y., Davidson, L., Schmid, M., Yates, T. & Spencer, M. D. (2017). Exploring Patient Awareness and Perceptions of the Appropriate Use of Antibiotics: A Mixed-Methods Study. *Antibiotics*, 6(4), 23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040023>
- de Vries, L. E., Vallès, Y., Agersø, Y., Vaishampayan, P. A., García-Montaner, A., Kuehl, J. V. & Francino, M. P. (2011). The Gut as Reservoir of Antibiotic Resistance: Microbial Diversity of Tetracycline Resistance in Mother and Infant. *PLoS ONE*, 6(6), e21644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021644>
- Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. (2014). Relatório nacional de monitorização do consumo de antimicrobianos em Portugal. Disponível em: <https://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=11370351&cboui=11370351>
- Edwards, B. & Gould, I. M. (2012). Antimicrobial stewardship: lessons from human healthcare. *Rev Sci Tech*, 31(1), 135–144. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22849273>
- European Food Safety Authority & European Center for Disease Prevention and Control. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, 16(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- Ege, M. J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W. O. C. M., Braun-Fahrlander, C. & von Mutius, E. (2011). Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *New England Journal of Medicine*, 364(8), 701–709. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007302>

- Eltai, N. O., Yassine, H. M., Al Thani, A. A., Abu Madi, M. A., Ismail, A., Ibrahim, E. & Alali, W. Q. (2018). Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from fecal samples of food handlers in Qatar. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7, 78. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0369-2>
- Epstein, M., Landsberg, G., Duncan, A. B., Lascelles, X., Marks, S. L., Acvim, D. & Tuzio, H. (2005). Senior Care Guidelines Task Force: Diplomate ABVP (Canine/Feline). *J Am Anim Hosp Assoc*, 41, 81–91.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017a). *Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union - ESAC-Net surveillance data*. Disponível em: [http://drive-ab.eu/wp-content/uploads/2014/09/WP1A\\_Final-QMs-QIs\\_final.pdf](http://drive-ab.eu/wp-content/uploads/2014/09/WP1A_Final-QMs-QIs_final.pdf)
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017b). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial REsistance Surveillance Network (EARS-Net)*. <https://doi.org/10.2900/296939>
- European Comission. (2017). *Better evidence and awareness of the challenges of AMR*. Disponível em: [https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr\\_summary\\_action\\_plan\\_2017\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_summary_action_plan_2017_en.pdf)
- European Medicines Agency. (2018). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016 - Trends from 2010 to 2016 Eighth ESVAC report*. Retrieved from [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_)
- European Medicines Agency, ESVAC. (2017). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Seventh ESVAC Report*. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf)
- Ford, R. B., Larson, L. J., McClure, K. D., Schultz, R. D., Delany, C., Ferris, K. & Jack, D. C. (2017). Report of the american animal hospital association (AAHA) Canine Vaccine Taskforce: 2017 canine vaccination guidelines, recommendations and supporting literature. *J. AM. Anim. Hosp. Asso*, 26-35.
- Gold, H. S., & Moellering, R. C. (1996). Antimicrobial-Drug Resistance. *New England Journal of Medicine*, 335(19), 1445–1453. <https://doi.org/10.1056/NEJM199611073351907>
- Grönthal, T., Österblad, M., Eklund, M., Jalava, J., Nykäsenoja, S., Pekkanen, K. & Rantala, M. (2018). Sharing more than friendship – transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 *Escherichia coli* between dogs and humans in a family, Finland, 2015. *Eurosurveillance*, 23(27). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1700497>
- Guardabassi, L. (2013). Sixty years of antimicrobial use in animals: what is next? *Veterinary Record*, 173(24), 599–603. <https://doi.org/10.1136/vr.f7276>
- Guardabassi, L. & Prescott, J. F. (2015). Antimicrobial Stewardship in Small Animal Veterinary Practice: From Theory to Practice. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 45(2), 361–376. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.005>
- Guardabassi, L., Schwarz, S., & Lloyd, D. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria: Review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 321–332. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh332>
- Gyles, C. (2016). One Medicine, One Health, One World. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 57(4), 345–346.

- Han, J.-I., Yang, C.-H. & Park, H.-M. (2016). Prevalence and risk factors of *Staphylococcus* spp. carriage among dogs and their owners: A cross-sectional study. *The Veterinary Journal*, 212, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.059>
- Hao, H., Sander, P., Iqbal, Z., Wang, Y., Cheng, G. & Yuan, Z. (2016). The Risk of Some Veterinary Antimicrobial Agents on Public Health Associated with Antimicrobial Resistance and their Molecular Basis. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1626. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01626>
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A. & Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hu, Y., Gao, G. F. & Zhu, B. (2017). The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Frontiers of Medicine*, 11(2), 161–168. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0531-x>
- Infarmed. (2014). *Utilização de Antibióticos em Portugal, Em meio ambulatório e em meio hospitalar*. Acedido em Set. 8, 2018. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2219894/Antibióticos+Ambulatório+Hospitalar+2011-2014/2b049547-7d08-4e06-b9fb-517c34e7b2d2>
- Ishii, J. B., Freitas, J. C. & Arias, M. V. B. (2011). Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(6), 533–537. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000600013>
- Jackson, C. R., Davis, J. A., Frye, J. G., Barrett, J. B. & Hiott, L. M. (2015). Diversity of Plasmids and Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Healthy Companion Animals. *Zoonoses and Public Health*, 62(6), 479–488. <https://doi.org/10.1111/zph.12178>
- Johnson, J. R., Owens, K., Gajewski, A. & Clabots, C. (2008). *Escherichia coli* Colonization Patterns among Human Household Members and Pets, with Attention to Acute Urinary Tract Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(2), 218–224. <https://doi.org/10.1086/524844>
- Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E. & Call, D. R. (2004). Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 752–757. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.752-757.2004>
- Lammie, S. L. & Hughes, J. M. (2016). Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 287–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033251>
- Leite-Martins, L. R., Mahú, M. I. M., Costa, A. L., Mendes, Â., Lopes, E., Mendonça, D. M. V. & da Costa, P. M. (2014). Prevalence of antimicrobial resistance in enteric *Escherichia coli* from domestic pets and assessment of associated risk markers using a generalized linear mixed model. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.09.008>
- Leonard, E. K., Pearl, D. L., Janecko, N., Finley, R. L., Reid-Smith, R. J., Scott Weese, J. & Peregrine, A. S. (2015). Risk factors for carriage of antimicrobial-resistant salmonella spp and *Escherichia coli* in pet dogs from volunteer households in Ontario, Canada, in 2005 and 2006. *American Journal of Veterinary Research*, 76(11), 959–968. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.11.959>

- Li, B., Yi, Y., Wang, Q., Woo, P. C. Y., Tan, L., Jing, H. & Liu, C. H. (2012). Analysis of Drug Resistance Determinants in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary-Care Hospital in Beijing, China. *PLoS ONE*, 7(7), e42280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042280>
- Ljungquist, O., Ljungquist, D., Myrenås, M., Rydén, C., Finn, M. & Bengtsson, B. (2016). Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs - a pilot study. *Infection Ecology & Epidemiology*, 6, 31514. <https://doi.org/10.3402/IEE.V6.31514>
- Loureiro, R. J., Roque, F., Teixeira Rodrigues, A., Herdeiro, M. T., & Ramalheira, E. (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/J.RPSP.2015.11.003>
- Magiorakos, a, Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. & Hindler, J. F. (2012). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Microbiology*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Manaia, C. M. (2017). Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends in Microbiology*, 25(3), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>
- Marks, S. L., Rankin, S. C., Byrne, B. A. & Weese, J. S. (2011). Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1195–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x>
- Martins da Costa, P., Loureiro, L. & Matos, A. (2013). Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(1), 278–294. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010278>
- Martins, L., Pina, S., Simões, R., de Matos, A., Rodrigues, P. & da Costa, P. (2013). Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multiresistant *E. coli* from cohabitant pets, humans, and household surfaces. *Journal of Environmental Health*, 75(6), 74–81.
- Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S. & Hirayama, K. (2017). Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 36(1), 27–31. <https://doi.org/10.12938/bmfh.BMFH-2016-021>
- McEwen. (2012). Quantitative human health risk assessments of antimicrobial use in animals and selection of resistance: a review of publicly available reports. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 261–276.
- McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34(s3), S93–S106. <https://doi.org/10.1086/340246>
- Mota, R. A., Chaves, K. P., Silva, D., Figueiroa, M., Freitas, L. De, José, W., ... Bento Galiza, L. (2005). Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 42(6), 465–470. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962005000600010>

- Mukerji, S., O'Dea, M., Barton, M., Kirkwood, R., Lee, T. & Abraham, S. (2017). Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 23–35. <https://doi.org/10.1042/EBC20160055>
- Mulder, I. E., Schmidt, B., Lewis, M., Delday, M., Stokes, C. R., Bailey, M. & Kelly, D. (2011). Restricting Microbial Exposure in Early Life Negates the Immune Benefits Associated with Gut Colonization in Environments of High Microbial Diversity. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028279>
- Mulder, I. E., Schmidt, B., Stokes, C. R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R. I. & Kelly, D. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-79>
- Murphy, C., Reid-Smith, R. J., Prescott, J. F., Bonnett, B. N., Poppe, C., Boerlin, P. & McEwen, S. A. (2009). Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 50(10), 1047–1053.
- Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I. F., Verspohl, J., Gerlach, G. F., Schwarz, S., ... Nolte, I. (2009). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: Two case reports. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(3), 660–662. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp243>
- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance.*
- Office Internationale des Epizooties. (2015a). *WHO, FAO, and OIE unite in the fight against Antimicrobial Resistance.*
- Office Internationale des Epizooties. (2015b). OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. *OIE International Committee*, 33 (May), 1–9.
- Ovejero, C. M., Escudero, J. A., Thomas-Lopez, D., Hoefer, A., Moyano, G., Montero, N. & Gonzalez-Zorn, B. (2017). *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST147 highly resistant to tigecycline from companion animals. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.02640-16>
- Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J., Lyra, C., Bengtsson-Palme, J., Larsson, D. G. J. & Virta, M. (2018). Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nature Communications*, 9(1), 3891. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06393-w>
- Payne, E., Bennett, P. C. & McGreevy, P. D. (2015). Current perspectives on attachment and bonding in the dog-human dyad. *Psychology Research and Behavior Management*, 8, 71–79. <https://doi.org/10.2147/PRBM.S74972>
- Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., van Duijkeren, E. & Törneke, K. (2016). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4). <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>
- Prescott, J. F., & Boerlin, P. (2016). Antimicrobial use in companion animals and Good Stewardship Practice. *Veterinary Record*, 179(19), 486–488. <https://doi.org/10.1136/vr.i5908>



- Prescott, J. F., Hanna, W. J. B., Reid-Smith, R. & Drost, K. (2002). Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 43(2), 107–116.
- Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos. (2017). *Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos 2017*. Acedido Out 27, 2018. Disponível em: [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)
- Pulcini, C., Ergönül, O., Can, F., & Beović, B. (2017). *Antimicrobial stewardship*. (Elsevier, Ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-04271-X>
- Pulcini, C., & Gyssens, I. C. (2013). How to educate prescribers in antimicrobial stewardship practices. *Virulence*, 4(2), 192–202. <https://doi.org/10.4161/viru.23706>
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning S. & Fitzpatrick, E. I. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (Second edi). John Wiley & Sons.
- R Studio. (2018). RStudio: Integrated development environment for R (Version 3.5.1). Boston, MA, USA. Disponível em: <https://www.rstudio.com/>
- Rantala, M., Lahti, E., Kuhalampil, J., Pesonen, S., Järvinen, A. K., Saijonmaa-Koulumies, & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(1–2), 37–45.
- Ripley, B., Venables, B., Bates, D., Hornik, K., Albrecht, G. & Firth, D. (2018). *Package "MASS."* Disponível em: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>
- Rocha-Gracia, R. C., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Bello, F., Martínez-Laguna, Y., & Torres, C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2  $\beta$ -lactamases. *The Veterinary Journal*, 203(3), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>
- Rutland, B. E., Weese, J. S., Bolin, C., Au, J., & Malani, A. N. (2009). Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), 1328–1330. <https://doi.org/10.3201/eid1508.081635>
- Sá, F., Fiol, D., & Groppo, F. C. (2000). Resistência Bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina* 10, 57(10), 1129–1140.
- Sanchez, S., Stevenson, M. a M., Charlene, R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q. & Hudson, C. R. (2002). Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs, 40(10), 3586–3595. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3586>
- Saputra, S., Jordan, D., Mitchell, T., Wong, H. S., Abraham, R. J., Kidsley, A. & Abraham, S. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from companion animals in Australia. *Veterinary Microbiology*, 211, 43–50. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2017.09.014>
- Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y. & Miller, R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1394–1404. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1394-1404.2005>

- Schmidt, Vanessa M; Williams, N. J. (2016). Raw pet food - Institute of Infection and Global Health - University of Liverpool. Acedido Abril 10, 2018. Disponível em: <https://www.liverpool.ac.uk/infection-and-global-health/research/pet-health/raw-pet-food/>
- Schmidt, V. M., Pinchbeck, G. L., Nuttall, T., McEwan, N., Dawson, S. & Williams, N. J. (2015). Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(1–2), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.013>
- Schwarz, S., Loeffler, A. & Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 82-e19. <https://doi.org/10.1111/vde.12362>
- Silva, K. C., Knobl, T. & Moreno, A. M. (2013). Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(3), 171–183. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i3p171-183>
- Souli, M., Galani, I., & Giamarellou, H. (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*, 13(47), 19045. <https://doi.org/10.2807/es.13.47.19045-en>
- Spohr, A., Schjøth, B., Wiinberg, B., Houser, G., Willesen, J., Jessen, L. R. & Jensen, V. F. (2012). *Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice*. (S. The Danish Small Animal Veterinary Association, Ed.). Copenhagen, Dinamarca.
- Stenske, K. A., Bemis, D. A., Gillespie, B. E., D'Souza, D. H., Oliver, S. P., Draughon, F. A. & Bartges, J. W. (2009). Comparison of clonal relatedness and antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. *American Journal of Veterinary Research*, 70(9), 1108–1116. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.9.1108>
- Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., & McDermott, P. F. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 18(5), 741–749. <https://doi.org/10.3201/eid1805.111153>
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., ... Ghali, W. A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Planetary Health*, 1(8), e316–e327. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)
- Trott, D. J., Filippich, L. J., Bensink, J. C., Downs, M. T., McKenzie, S. E., Townsend, K. M. & Chin, J. J. C. (2004). Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliforms and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(5), 439–443. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05473-0>
- Tuerena, I., Williams, N. J., Nuttall, T., & Pinchbeck, G. (2016). Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in hospitalised companion animals and their hospital environment. *Journal of Small Animal Practice*, 57(7), 339–347. <https://doi.org/10.1111/jsap.12525>
- Umber, J. K., & Bender, J. B. (2009). Pets and Antimicrobial Resistance. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 39(2), 279–292. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.10.016>

- União Europeia. (2015). *Comunicação da Comissão — Orientações para a utilização prudente de agentes antimicrobianos na medicina veterinária*. Retrieved from [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/antimicrobial\\_resistance/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/antimicrobial_resistance/index_en.htm)
- Vaarten, J. (2012). Clinical impact of antimicrobial resistance in humans. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 211–220. <https://doi.org/10.1038/nature/10388>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P. & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Boeckel, T. P., Glennon, E. E., Chen, D., Gilbert, M., Robinson, T. P., Grenfell, B. T. & Laxminarayan, R. (2017a). Reducing antimicrobial use in food animals. *Science*, 357(6358), 1350–1352. <https://doi.org/10.1126/science.aao1495>
- Van Duijkeren, E., Wolfhagen, M. J. H. M., Box, A. T. A., Heck, M. E. O. C., Wannet, W. J. B. & Fluit, A. C. (2004). Human-to-Dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12).
- Ventola, C. L. (2015). The beginning of the end of the antibiotic era? Part I. The problem: abuse of the “miracle drugs”. *Quintessence International*, 40(4), 277–283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Wedley, A. L., Dawson, S., Maddox, T. W., Coyne, K. P., Pinchbeck, G. L., Clegg, P. & Williams, N. J. (2017). Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. *Veterinary Microbiology*, 199, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.017>
- Weese, J. S., Giguère, S., Guardabassi, L., Morley, P. S., Papich, M., Ricciuto, D. R., & Sykes, J. E. (2015). ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 487–498. <https://doi.org/10.1111/jvim.12562>
- World Health Organization. (2014). *WHO's first global report on Antimicrobial resistance: global report on surveillance*.
- World Health Organization. (2017). *WHO Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5th revision*.
- World Health Organization. (2018). WHO | High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. *WHO*.
- Wooldridge, M. (2012). Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 231–247.
- Zarb, P., & Goossens, H. (2012). Human use of antimicrobial agents. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 121–133.
- Zhang, L., Kinkelaar, D., Huang, Y., Li, Y., Li, X., & Wang, H. H. (2011). Acquired antibiotic resistance: are we born with it? *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7134–7141. <https://doi.org/10.1128/AEM.05087-11>

## Anexos

Anexo 1. Questionário “Identificação de fatores de risco responsáveis pela ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em animais de companhia.”

QUESTIONÁRIO
Identificação de fatores de risco responsáveis pela ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em animais de companhia
Caro(a) Cliente:
Este inquérito tem o objetivo de identificar potenciais fatores de risco associados à ocorrência de antibiorresistências em animais de companhia. É realizado no âmbito de uma dissertação de mestrado em medicina veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.
O questionário é anónimo e estima-se um tempo médio de 2 minutos para o seu preenchimento.
A sua opinião e o relato dos factos que conhece são de extrema importância, pelo que solicitamos a melhor colaboração.
Muito Obrigada,
Maria Margarida e Oliveira Algeós Silva
Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária,
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
“Antibióticos são medicamentos, frequentemente, usados em animais de companhia em medicina veterinária. Muitos desses medicamentos são os mesmos ou muito parecidos com aqueles usados no tratamento de infeções bacterianas em medicina humana.
Os animais partilham as nossas casas aumentando o risco de transmissão de doenças. O fato de ser tutor de um animal é um conhecido fator de risco para infeções bacterianas.”
<i>British Small Animal Veterinary Association</i>

<b>Secção A – Informação relativa ao <u>animal de companhia</u></b>			
<input type="radio"/> Saudável	<input type="radio"/> Desparasitado	<input type="radio"/> Vacinado	<input type="radio"/> Esterilizado
<b>Idade do animal de companhia:</b>			
<input type="radio"/> _____ meses	<input type="radio"/> _____ anos		
<b>1. O seu animal de companhia tomou, alguma vez, um antibiótico?</b>			
<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não. Passe à questão 5.	<input type="radio"/> Não sei. Passe à questão 5.	
<b>2. Para que tipo de situação foi o antibiótico administrado? (Pode assinalar mais do que uma opção)</b>			
<input type="radio"/> Gastrointestinal	<input type="radio"/> Oftalmologia	<input type="radio"/> Respiratória	<input type="radio"/> Otites
<input type="radio"/> Dermatológica	<input type="radio"/> Como medicação pós cirúrgica	<input type="radio"/> Não sei	
<b>3. Sabe qual o nome do antibiótico que foi administrado ao seu animal de companhia?</b>			
<input type="radio"/> Sim. Qual? _____		<input type="radio"/> Não	
<b>4. O último tratamento com antibiótico que o seu animal fez foi aconselhado por:</b>			
<input type="radio"/> Médico Saúde Humana	<input type="radio"/> Médico Veterinário	<input type="radio"/> Amigos/Conhecidos não ligados à área da saúde	
<b>5. Qual o tipo de alimentação ingerida pelo seu animal? (Pode assinalar mais do que uma opção)</b>			
<input type="radio"/> Seca	<input type="radio"/> Húmida	<input type="radio"/> Crua	<input type="radio"/> Caseira
<input type="radio"/> Guloseimas			
<b>6. Que tipo de acesso ao exterior tem o seu animal de companhia? (Pode assinalar mais do que uma opção)</b>			
<input type="radio"/> Permanente (vive no jardim/varanda)	<input type="radio"/> Acesso livre (sai e entra quando quer)	<input type="radio"/> Passeio à trela	<input type="radio"/> Nenhum
<b>7. O seu animal de companhia tem acesso à cama/sofá dos tutores?</b>			
<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não	
<b>8. O seu animal de companhia tem acesso a objetos pessoais dos tutores? (ex. rói sapatos, lambe pratos)</b>			
<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não	
<b>9. O seu animal de companhia demonstra afeto lambendo a cara/ mãos do tutor?</b>			
<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não	
<b>10. O seu animal interage com mais algum animal de companhia <u>em casa</u>?</b>			
<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não. Passe para a pergunta 13.	
<b>11. Se respondeu sim na pergunta anterior, qual/quais a(s) espécie(s) com que o animal interage?</b>			
<input type="radio"/> Cão	<input type="radio"/> Gato	<input type="radio"/> Lagomorfo (ex.: coelho)	<input type="radio"/> Réptil
<input type="radio"/> Roedor	<input type="radio"/> Peixes	<input type="radio"/> Outro: _____	
<b>12. Esse(s) animal(is) já foi/foram tratado(s), alguma vez, com algum antibiótico?</b>			
<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Não sei	

**13. Com que frequência costuma frequentar o hospital veterinário? (Pode assinalar mais do que uma opção)**

☐ Anualmente

☐ Semestralmente

☐ Trimestralmente

☐ Mensalmente

☐ Semanalmente

☐ Diariamente

## **Secção B – Informação relativa ao tutor/agregado familiar**

**1. Frequenta o meio hospitalar/clínico de medicina humana desde que adquiriu o seu animal?**

☐ Sim

☐ Não. Passe à pergunta 5.

**2. Frequentou o meio hospitalar/clínico de medicina humana no último ano?**

☐ Sim

☐ Não

**3. Frequenta o meio hospitalar/clínico de medicina humana devido a qual/ quais das seguintes situações?**

☐ Situação profissional (ex.: *staff* hospitalar)

☐ Consulta (rotina)

☐ Voluntariado

☐ Visita a familiar/amigo

☐ Cirurgia/Internamento

**4. Se a sua situação profissional está relacionada com hospital/clínica indique qual.**

☐ Médico

☐ Enfermeiro

☐ Técnico de saúde

☐ Auxiliar ação médica

☐ Laboratório

☐ Secretariado

☐ Não se aplica

☐ Outro: \_\_\_\_\_

**5. Onde o animal reside existe alguma pessoa sujeita a cuidados continuados por um técnico de saúde?**

☐ Sim

☐ Não

**6. Tomou algum antibiótico desde que adquiriu o seu animal?**

☐ Sim

☐ Não

**7. Se sim, sabe qual o nome do antibiótico?**

☐ Sim. Qual(ais)? \_\_\_\_\_

☐ Não sei

Anexo 2. Associação entre fatores de risco e a exposição a antibiótico (n=141)

		Animal exposto a antibioterapia prévia		
		Não	Sim	Fisher's p
Desparasitado	Não	11 91,7 %	1 8,3 %	0,056
	Sim	80 62 %	49 38 %	
Vacinado	Não	10 90,9 %	1 9,1 %	0,097
	Sim	80 62 %	49 38 %	
Esterilizado	Não	80 85,1 %	14 14,9 %	0,000
	Sim	11 23,4 %	36 76,6 %	
IdadeEstrato	Jovem	55 88,7 %	7 11,3 %	0,000
	Adulto	30 56,6 %	23 43,4 %	
	Sénior	6 23,1 %	20 76,9 %	
ABgastrointestinal	Não	0 0 %	43 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	7 100 %	
ABoftalmologia	Não	0 0 %	37 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	13 100 %	
ABrespiratória	Não	0 0 %	45 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	5 100 %	
ABotites	Não	0 0 %	32 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	18 100 %	
ABdermatologia	Não	0 0 %	43 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	7 100 %	
ABmedicaçãoposcx	Não	0 0 %	23 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	27 100 %	
ABnãosei	Não	0 0 %	47 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	3 100 %	

## Anexo 2 (continuação)

ABnomeCão	Não	0 0 %	25 100 %	1,000
	Sim	0 0 %	25 100 %	
ABmedvetVSmedhum	Sim	0 0 %	2 100 %	1,000
	Não sei	0 0 %	48 100 %	
AlimentaçãoSeca	Não	1 50 %	1 50 %	1,000
	Sim	90 64,7 %	49 35,3 %	
AlimentaçãoHúmida	Não	76 65 %	41 35 %	0,819
	Sim	15 62,5 %	9 37,5 %	
AlimentaçãoCrua	Não	91 64,5 %	50 35,5 %	-
	Sim	-	-	
AlimentaçãoCaseira	Não	77 67 %	38 33 %	0,257
	Sim	14 53,8 %	12 46,2 %	
AlimentaçãoGuloseimas	Não	44 64,7 %	24 35,3 %	1,000
	Sim	47 64,4 %	26 35,6 %	
AcessoPermanente	Não	79 65,8 %	41 34,2 %	0,450
	Sim	11 55 %	9 45 %	
AcessoLivreExt	Não	72 67,3 %	35 32,7 %	0,315
	Sim	19 55,9 %	15 44,1 %	
PasseioTrela	Não	37 77,1 %	11 22,9 %	0,027
	Sim	54 58,1 %	39 41,9 %	
AcessoExtZero	Não	69 58 %	50 42 %	0,000
	Sim	22 100 %	0 0 %	
AcessoCama	Não	17 58,6 %	12 41,4 %	0,596
	Sim	74 66,1 %	38 33,9 %	
AcessoObjetos	Não	20 60,6 %	13 39,4 %	0,740
	Sim	71 65,7 %	37 34,3 %	



Anexo 2 (continuação)

06	InteraçãoLambeTutor	Não	3 60 %	2 40 %	1,000
		Sim	88 64,7 %	48 35,3 %	
	AnimaisCoabitantes	Não	48 69,6 %	21 30,4 %	0,296
		Sim	43 59,7 %	29 40,3 %	
	CoabitanteCão	Não	8 42,1 %	11 57,9 %	0,098
		Sim	35 67,3 %	17 32,7 %	
	CoabitanteGato	Não	25 65,8 %	13 34,2 %	0,469
		Sim	18 54,5 %	15 45,5 %	
	CoabitanteLagomorfo	Não	37 57,8 %	27 42,2 %	0,232
		Sim	6 85,7 %	1 14,3 %	
	CoabitanteRéptil	Não	43 60,6 %	28 39,4 %	0,075
		Sim	-	-	
	CoabitanteRoedor	Não	42 62,7 %	25 37,3 %	0,293
		Sim	1 25 %	3 75 %	
	CoabitantePeixes	Não	43 65,2 %	23 34,8 %	0,008
		Sim	0 0 %	5 100 %	
07	CoabitanteOutro	Não	40 58,8 %	28 41,2 %	0,273
		Sim	3 100 %	0 0 %	
	FreqMedVet	Anual	30 50,8 %	29 49,2 %	0,000
		Semestral	4 30,8 %	9 69,2 %	
		Trimestral	13 61,9 %	8 38,1 %	
		Mensal	30 96,8 %	1 3,2 %	
		Semanal	5 83,3 %	1 16,7 %	
		Diária	1 100 %	0 0 %	
	FreqHospDesdeAnimal	Não	26 81,2 %	6 18,8 %	0,034
		Sim	65 59,6 %	44 40,4 %	

Anexo 2 (continuação)

FreqHospUltimoAno	Não	26 72,2 %	10 27,8 %	0,360
	Sim	65 61,9 %	40 38,1 %	
FreqHospProfissão	Não	36 57,1 %	27 42,9 %	0,679
	Sim	32 62,7 %	19 37,3 %	
FreqHospConsulta	Não	31 62 %	19 38 %	0,795
	Sim	37 57,8 %	27 42,2 %	
FreqHospVoluntariado	Não	67 59,8 %	45 40,2 %	1,000
	Sim	1 50 %	1 50 %	
FreHospVisita	Não	61 62,2 %	37 37,8 %	0,180
	Sim	7 43,8 %	9 56,2 %	
FreqHospCxlnt	Não	63 64,3 %	35 35,7 %	0,025
	Sim	5 31,2 %	11 68,8 %	
ProfissãoHosp	Médico	19 70,4 %	8 29,6 %	0,710
	Enfermeiro	6 54,5 %	5 45,5 %	
	Técnico de saúde	5 71,4 %	2 28,6 %	
	Auxiliar de ação médica	0 0 %	1 100 %	
	Laboratório	1 33,3 %	2 66,7 %	
	Secretariado	32 56,1 %	25 43,9 %	
	Não se aplica	2 50 %	2 50 %	
CuidadosCont	Não	90 64,7 %	49 35,3 %	1,000
	Sim	1 50 %	1 50 %	
TutorAB	Não	69 81,2 %	16 18,8 %	0,000
	Sim	21 38,2 %	34 61,8 %	
TutorNomeAB	Não	17 37 %	29 63 %	0,831
	Sim	4 40,0 %	6 60,0 %	

Anexo 3. Associação de fatores de risco com os padrões de resistência antimicrobiana dos isolados de *E. coli* (n=62)

		MDR			XDR			PDR		
		Não	Sim	Fisher's p	Não	Sim	Fisher's p	Não	Sim	Fisher's p
Desparasitado	Não	0 0 %	7 100 %	1,000	3 42,9 %	4 57,1 %	0,425	3 42,9 %	4 57,1 %	0,082
	Sim	7 12,7 %	48 87,3 %		34 61,8 %	21 38,2 %		42 76,4 %	13 23,6 %	
Vacinado	Não	0 0 %	7 100 %	1,000	3 42,9 %	4 57,1 %	0,425	3 42,9 %	4 57,1 %	0,082
	Sim	7 12,7 %	48 87,3 %		4 61,8 %	21 38,2 %		42 76,4 %	13 23,6 %	
Esterilizado	Não	7 12,5 %	49 87,5 %	1,000	33 58,9 %	23 41,1 %	1,000	41 73,2 %	15 26,8 %	0,662
	Sim	0 0 %	6 100 %		4 66,7 %	2 33,3 %		4 66,7 %	2 33,3 %	
IdadeEstrato	Jovem	2 5,6 %	34 94,4 %	0,017	16 44,4 %	20 55,6 %	0,016	23 63,9 %	13 36,1 %	0,215
	Adulto	2 10 %	18 90 %		16 80 %	4 20 %		17 85 %	3 15 %	
	Sênior	3 50 %	3 50 %		5 83,3 %	1 16,7 %		5 83,3 %	1 16,7 %	
AlimentaçãoSeca	Não	0 0 %	1 100 %	1,000	1 100 %	0 0 %	1,000	1 100 %	0 0 %	1,000
	Sim	7 11,5 %	54 88,5 %		36 59 %	25 41 %		44 72,1 %	17 27,9 %	
AlimentaçãoHúmida	Não	7 13,5 %	45 86,5 %	0,586	31 59,6 %	21 40,4 %	1,000	36 69,2 %	16 30,8 %	0,260
	Sim	0 0 %	10 100 %		6 60 %	4 40 %		9 90 %	1 10 %	
AlimentaçãoCrua	Não	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sim	-	-		-	-		-	-	
AlimentaçãoCaseira	Não	6 11,5 %	46 88,5 %	1,000	29 55,8 %	23 44,2 %	0,182	37 71,2 %	15 28,8 %	0,713
	Sim	1 10 %	9 90 %		8 80 %	2 20 %		8 80 %	2 20 %	
AlimentaçãoGuloseimas	Não	1 3,6 %	27 96,4 %	0,116	15 53,6 %	13 46,4 %	0,529	18 64,3 %	10 35,7 %	0,254
	Sim	6 17,6 %	28 82,4 %		22 64,7 %	12 35,3 %		27 79,4 %	7 20,6 %	
AcessoPermanenteExt	Não	7 13,7 %	44 86,3 %	0,587	30 58,8 %	21 41,2 %	0,726	37 72,5 %	14 27,5 %	1,000
	Sim	0 0 %	10 100 %		7 70 %	3 30 %		7 70 %	3 30 %	
AcessoLivreExt	Não	2 4,1 %	47 95,9 %	0,003	25 51 %	24 49 %	0,009	32 65,3 %	17 34,7 %	0,013
	Sim	5 38,5 %	8 61,5 %		12 92,3 %	1 7,7 %		13 100 %	0 0 %	
PasseioTrela	Não	0 0 %	27 100 %	0,015	13 48,1 %	14 51,9 %	0,172	16 59,3 %	11 40,7 %	0,049
	Sim	7 20 %	28 80 %		24 68,6 %	11 31,4 %		29 82,9 %	6 17,1 %	

## Anexo 3 (continuação)

AcessoExtZero	Não	7 14,9 %	40 85,1 %	0,180	33 70,2 %	14 29,8 %	0,005	38 80,9 %	9 19,1 %	0,018
	Sim	0 0 %	15 100 %		4 26,7 %	11 73,3 %		7 46,7 %	8 53,3 %	
AcessoCama	Não	1 8,3 %	11 91,7 %	1,000	6 50 %	6 50 %	0,521	8 66,7 %	4 33,3 %	0,721
	Sim	6 12 %	44 88 %		31 62 %	19 38 %		37 74 %	13 26 %	
AcessoObjetos	Não	1 7,1 %	13 92,9 %	1,000	6 42,9 %	8 57,1 %	0,216	8 57,1 %	6 42,9 %	0,178
	Sim	6 12,5 %	42 87,5 %		31 64,6 %	17 35,4 %		37 77,1 %	11 22,9 %	
InteraçãoLambeTutor	Não	0 0 %	3 100 %	1,000	2 66,7 %	1 33,3 %	1,000	2 66,7 %	1 33,3 %	1,000
	Sim	7 11,9 %	52 88,1 %		35 59,3 %	24 40,7 %		43 72,9 %	16 27,1 %	
AnimaisCoabitantes	Não	1 3 %	32 97 %	0,044	19 57,6 %	14 42,4 %	0,920	23 69,7 %	10 30,3 %	0,776
	Sim	6 20,7 %	23 79,3 %		18 62,1 %	11 37,9 %		22 75,9 %	7 24,1 %	
CoabitanteCão	Não	0 0 %	5 100 %	0,553	2 40 %	3 60 %	0,339	4 80 %	1 20 %	1,000
	Sim	6 25 %	18 75 %		16 66,7 %	8 33,3 %		18 75 %	6 25 %	
CoabitanteGato	Não	5 29,4 %	12 70,6 %	0,354	10 58,8 %	7 41,2 %	0,717	13 76,5 %	4 23,5 %	1,000
	Sim	1 8,3 %	11 91,7 %		8 66,7 %	4 33,3 %		9 75 %	3 25 %	
CoabitanteLagomorfo	Não	6 23,1 %	20 76,9 %	1,000	17 65,4 %	9 34,6 %	0,539	21 80,8 %	5 19,2 %	0,136
	Sim	0 0 %	3 100 %		1 33,3 %	2 66,7 %		1 33,3 %	2 66,7 %	
	Sim	-	-		-	-		-	-	
CoabitanteRoedor	Não	6 21,4 %	22 78,6 %	1,000	18 64,3 %	10 35,7 %	0,379	21 75 %	7 25 %	1
	Sim	0 0 %	1 100 %		0 0 %	1 100 %		1 100 %	0 0 %	
FreqMedVet	Anual	5 21,7 %	18 78,3 %	0,483	18 78,3 %	5 21,7 %	0,109	18 78,3 %	5 21,7 %	0,434
	Semestral	0 0 %	1 100 %		1 100 %	0 0 %		1 100 %	0 0 %	
	Trimestral	1 12,5 %	7 87,5 %		3 37,5 %	5 62,5 %		5 62,5 %	3 37,5 %	
	Mensal	1 4,5 %	21 95,5 %		11 50 %	11 50 %		17 77,3 %	5 22,7 %	
	Semanal	0 0 %	1 100 %		0 0 %	1 100 %		0 0 %	1 100 %	
	Diária	0 0 %	1 100 %		1 100 %	0 0 %		1 100 %	0 0 %	

## Anexo 3 (continuação)

FreqHospDesdeAnimal	Não	1 5,6 %	17 94,4 %	0,662	4 22,2 %	14 77,8 %	0,000	8 44,4 %	10 55,6 %	0,004
	Sim	6 13,6 %	38 86,4 %		33 75 %	11 25 %		37 84,1 %	7 15,9 %	
FreqHospUltimoAno	Não	1 5,6 %	17 94,4 %	0,662	4 22,2 %	14 77,8 %	0,000	8 44,4 %	10 55,6 %	0,004
	Sim	6 13,6 %	38 86,4 %		33 75 %	11 25 %		37 84,1 %	7 15,9 %	
FreqHospProfissão	Não	2 9,5 %	19 90,5 %	0,670	14 66,7 %	7 33,3 %	0,743	17 81 %	4 19 %	1
	Sim	4 16,7 %	20 83,3 %		18 75 %	6 25 %		20 83,3 %	4 16,7 %	
FreqHospConsulta	Não	4 17,4 %	19 82,6 %	0,665	17 73,9 %	6 26,1 %	0,749	20 87 %	3 13 %	0,459
	Sim	2 9,1 %	20 90,9 %		15 68,2 %	7 31,8 %		17 77,3 %	5 22,7 %	
FreqHospVoluntariado	Não	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sim	-	-		-	-		-	-	
FreqHospVisita	Não	6 15 %	34 85 %	1	28 70 %	12 30 %	1	33 82,5 %	7 17,5 %	1
	Sim	0 0 %	5 100 %		4 80 %	1 20 %		4 80 %	1 20 %	
FreqHospCxInt	Não	6 14,6 %	35 85,4 %	1	30 73,2 %	11 26,8 %	0,567	33 80,5 %	8 19,5 %	1
	Sim	0 0 %	4 100 %		2 50 %	2 50 %		4 100 %	0 0 %	
ProfissãoHosp	Médico	2 16,7 %	10 83,3 %	0,672	11 91,7 %	1 8,3 %	0,277	11 91,7 %	1 8,3 %	0,536
	Enfermeiro	1 25 %	3 75 %		2 50 %	2 50 %		3 75 %	1 25 %	
	Técnico de saúde	0 0 %	5 100 %		3 60 %	2 40 %		4 80 %	1 20 %	
	Auxiliar de ação médica	2 9,5 %	19 90,5 %		14 66,7 %	7 33,3 %		17 81 %	4 19 %	
	Laboratório	0 0 %	2 100 %		1 50 %	1 50 %		1 50 %	1 50 %	
Cuidadoscont	Não	7 11,5 %	54 88,5 %	1	37 60,7 %	24 39,3 %	0,403	45 73,8 %	16 26,2 %	0,274
	Sim	0 0 %	1 100 %		0 0 %	1 100 %		0 0 %	1 100 %	
TutorAB	Não	5 10,6 %	42 89,4 %	1	25 53,2 %	22 46,8 %	0,078	33 70,2 %	14 29,8 %	0,528
	Sim	2 13,3 %	13 86,7 %		12 80 %	3 20 %		12 80 %	3 20 %	
TutorNomeAB	Não	2 15,4 %	11 84,6 %	1	10 76,9 %	3 23,1 %	1	10 76,9 %	3 23,1 %	1
	Sim	0 0 %	2 100 %		2 100 %	0 0 %		2 100 %	0 0 %	

Anexo 4. Associação de Fatores de Risco com os padrões de resistência antimicrobiana dos isolados de *E. coli* (n=248)

		MDR			XDR			PDR		
		Não	Sim	Fisher's p	Não	Sim	Fisher's p	Não	Sim	Fisher's p
Desparasitado	Não	6 21,4 %	22 78,6 %	0,506	18 64,3 %	10 35,7 %	0,155	23 82,1 %	5 17,9 %	0,353
	Sim	65 29,5 %	155 70,5 %		171 77,7 %	49 22,3 %		195 88,6 %	25 11,4 %	
Vacinado	Não	5 17,9 %	23 82,1 %	0,266	15 53,6 %	13 46,4 %	0,008	21 75 %	7 25 %	0,057
	Sim	66 30 %	154 70 %		174 79,1 %	46 20,9 %		197 89,5 %	23 10,5 %	
Esterilizado	Não	66 29,5 %	158 70,5 %	0,480	172 76,8 %	52 23,2 %	0,614	198 88,4 %	26 11,6 %	0,507
	Sim	5 20,8 %	19 79,2 %		17 70,8 %	7 29,2 %		20 83,3 %	4 16,7 %	
IdadeEstrato	Jovem	26 18,1 %	118 81,9 %	0,000	98 68,1 %	46 31,9 %	0,002	121 84 %	23 16 %	0,044
	Adulto	32 40 %	48 60 %		71 88,8 %	9 11,2 %		76 95 %	4 5 %	
	Sênior	13 54,2 %	11 45,8 %		20 83,3 %	4 16,7 %		21 87,5 %	3 12,5 %	
AlimentaçãoSeca	Não	1 25 %	3 75 %	1,000	4 100 %	0 0 %	0,575	4 100 %	0 0 %	1,000
	Sim	70 28,7 %	174 71,3 %		185 75,8 %	59 24,2 %		214 87,7 %	30 12,3 %	
AlimentaçãoHúmida	Não	62 29,8 %	146 70,2 %	0,456	185 75,8 %	59 24,2 %	0,995	181 87 %	27 13 %	0,434
	Sim	9 22,5 %	31 77,5 %		31 77,5 %	9 22,5 %		37 92,5 %	3 7,5 %	
AlimentaçãoCrua	Não	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sim	-	-		-	-		-	-	
AlimentaçãoCaseira	Não	58 27,9 %	150 72,1 %	0,689	156 75 %	52 25 %	0,414	181 87 %	27 13 %	0,434
	Sim	13 32,5 %	27 67,5 %		33 82,5 %	7 17,5 %		37 92,5 %	3 7,5 %	
AlimentaçãoGuloseimas	Não	21 18,8 %	91 81,2 %	0,003	78 69,6 %	34 30,4 %	0,040	92 82,1 %	20 17,9 %	0,020
	Sim	50 36,8 %	86 63,2 %		111 81,6 %	25 18,4 %		126 92,6 %	10 7,4 %	
AcessoPermanenteExt	Não	65 31,9 %	139 68,1 %	0,050	151 74 %	53 26 %	0,103	177 86,8 %	27 13,2 %	0,433
	Sim	6 15 %	34 85 %		35 87,5 %	5 12,5 %		37 92,5 %	3 7,5 %	
AcessoLivreExt	Não	41 20,9 %	155 79,1 %	0,000	140 71,4 %	56 28,6 %	0,001	166 84,7 %	30 15,3 %	0,001
	Sim	30 57,7 %	22 42,3 %		49 94,2 %	3 5,8 %		52 100 %	0 0 %	
PasseioTrela	Não	16 14,8 %	92 85,2 %	0,000	73 67,6 %	35 32,4 %	0,008	88 81,5 %	20 18,5 %	0,011
	Sim	55 39,3 %	85 60,7 %		116 82,9 %	24 17,1 %		130 92,9 %	10 7,1 %	

Anexo 4 (continuação)

AcessoExtZero	Não	66 35,1 %	122 64,9 %	0,000	159 84,6 %	29 15,4 %	0,000	175 93,1 %	13 6,9 %	0,000
	Sim	5 8,3 %	55 91,7 %		30 50 %	30 50 %		43 71,7 %	17 28,3 %	
AcessoCama	Não	10 20,8 %	38 79,2 %	0,249	35 72,9 %	13 27,1 %	0,683	43 89,6 %	5 10,4 %	0,809
	Sim	61 30,5 %	139 69,5 %		154 77 %	46 23 %		175 87,5 %	25 12,5 %	
AcessoObjetos	Não	9 16,1 %	47 83,9 %	0,028	37 66,1 %	19 33,9 %	0,065	43 76,8 %	13 23,2 %	0,009
	Sim	62 32,3 %	130 67,7 %		152 79,2 %	40 20,8 %		175 91,1 %	17 8,9 %	
InteraçãoLambeTutor	Não	1 8,3 %	11 91,7 %	0,188	8 66,7 %	4 33,3 %	0,487	9 75 %	3 25 %	0,165
	Sim	70 29,7 %	166 70,3 %		181 76,7 %	55 23,3 %		209 88,6 %	27 11,4 %	
AnimaisCoabitantes	Não	32 24,2 %	100 75,8 %	0,136	97 73,5 %	35 26,5 %	0,355	115 87,1 %	17 12,9 %	0,835
	Sim	39 33,6 %	77 66,4 %		92 79,3 %	24 20,7 %		103 88,8 %	13 11,2 %	
CoabitanteCão	Não	3 15 %	17 85 %	0,069	14 70 %	6 30 %	0,361	17 85 %	3 15 %	0,695
	Sim	36 37,5 %	60 62,5 %		78 81,2 %	18 18,8 %		86 89,6 %	10 10,4 %	
CoabitanteGato	Não	30 44,1 %	38 55,9 %	0,008	50 73,5 %	18 26,5 %	0,110	60 88,2 %	8 11,8 %	1,000
	Sim	9 18,8 %	39 81,2 %		42 87,5 %	6 12,5 %		43 89,6 %	5 10,4 %	
CoabitanteLagomorfo	Não	35 33,7 %	69 66,3 %	1,000	82 78,8 %	22 21,2 %	1,000	93 89,4 %	11 10,6 %	0,623
	Sim	4 33,3 %	8 66,7 %		10 83,3 %	2 16,7 %		10 83,3 %	2 16,7 %	
CoabitanteRéptil	Não	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sim	-	-		-	-		-	-	
CoabitanteRoedor	Não	39 34,8 %	73 65,2 %	0,299	90 80,4 %	22 19,6 %	0,189	99 88,4 %	13 11,6 %	1,000
	Sim	0 0 %	4 100 %		2 50 %	2 50 %		4 100 %	0 0 %	
	Sim	-	-		-	-		-	-	
FreqMedVet	Anual	43 46,7 %	49 53,3 %	0,000	76 82,6 %	16 17,4 %	0,226	82 89,1 %	10 10,9 %	0,427
	Semestral	2 50 %	2 50 %		4 100 %	0 0 %		4 100 %	0 0 %	
	Trimestral	10 31,2 %	22 68,8 %		24 75 %	8 25 %		29 90,6 %	3 9,4 %	
	Mensal	11 12,5 %	77 87,5 %		63 71,6 %	25 28,4 %		78 88,6 %	10 11,4 %	
	Semanal	1 25 %	3 75 %		2 50 %	2 50 %		3 75 %	1 25 %	
	Diária	2 50 %	2 50 %		4 100 %	0 0 %		4 100 %	0 0 %	

Anexo 4 (continuação)

FreqHospDesdeAnimal	Não	11 15,3 %	61 84,7 %	0,005	40 55,6 %	32 44,4 %	0,000	54 75 %	18 25 %	0,000
	Sim	60 34,1 %	116 65,9 %		149 84,7 %	27 15,3 %		164 93,2 %	12 6,8 %	
FreqHospUltimoAno	Não	11 15,3 %	61 84,7 %	0,005	40 55,6 %	32 44,4 %	0,000	54 75 %	18 25 %	0,000
	Sim	60 34,1 %	116 65,9 %		149 84,7 %	27 15,3 %		164 93,2 %	12 6,8 %	
FreqHospProfissão	Não	19 22,6 %	65 77,4 %	0,016	66 78,6 %	18 21,4 %	0,316	76 90,5 %	8 9,5 %	0,388
	Sim	39 40,6 %	57 59,4 %		82 85,4 %	14 14,6 %		91 94,8 %	5 5,2 %	
FreqHospConsulta	Não	36 39,1 %	56 60,9 %	0,062	79 85,9 %	13 14,1 %	0,265	87 94,6 %	5 5,4 %	0,398
	Sim	22 25 %	66 75 %		69 78,4 %	19 21,6 %		80 90,9 %	8 9,1 %	
FreqHospVoluntariado	Não	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sim	-	-		-	-		-	-	
FreqHospVisita	Não	55 34,4 %	105 65,6 %	0,126	130 81,2 %	30 18,8 %	0,535	149 93,1 %	11 6,9 %	0,641
	Sim	3 15 %	17 85 %		18 90 %	2 10 %		18 90 %	2 10 %	
FreqHospCxInt	Não	57 34,8 %	107 65,2 %	0,023	137 83,5 %	27 16,5 %	0,167	151 92,1 %	13 7,9 %	0,610
	Sim	1 6,2 %	15 93,8 %		11 68,8 %	5 31,2 %		16 100 %	0 0 %	
ProfissãoHosp	Médico	23 47,9 %	25 52,1 %	0,005	45 93,8 %	3 6,2 %	0,046	46 95,8 %	2 4,2 %	0,696
	Enfermeiro	8 50 %	8 50 %		12 75 %	4 25 %		15 93,8 %	1 6,2 %	
	Técnico de saúde	4 20 %	16 80 %		16 80 %	4 20 %		19 95 %	1 5 %	
	Secretariado	19 22,6 %	65 77,4 %		66 78,6 %	18 21,4 %		76 90,5 %	8 9,5 %	
	Não se aplica	0 0 %	8 100 %		5 62,5 %	3 37,5 %		7 87,5 %	1 12,5 %	
CuidadosCont	Não	71 29,1 %	173 70,9 %	0,581	187 76,6 %	57 23,4 %	0,241	216 88,5 %	28 11,5 %	0,073
	Sim	0 0 %	4 100 %		2 50 %	2 50 %		2 50 %	2 50 %	
TutorAB	Não	51 27,1 %	137 72,9 %	0,446	139 73,9 %	49 26,1 %	0,189	164 87,2 %	24 12,8 %	0,655
	Sim	20 33,3 %	40 66,7 %		50 83,3 %	10 16,7 %		54 90 %	6 10 %	
TutorNomeAB	Não	19 36,5 %	33 63,5 %	0,251	42 80,8 %	10 19,2 %	0,351	46 88,5 %	6 11,5 %	0,606
	Sim	1 12,5 %	7 87,5 %		8 100 %	0 0 %		8 100 %	0 0 %	



Anexo 5. Associação dos antimicrobianos estudados com os fatores de risco.

Antimicrobiano	Fator de risco	Odds Ratio	OR 95% IC	Desvio padrão	Valor p
Ácido Nalidíxico	Idade jovem	4,71	[1,03;1,56]	3,66	0,046
	Idade sénior	0,43	[0,07;2,76]	0,41	0,373
	Acesso livre exterior	0,27	[0,07;1,05]	0,19	0,059
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,43	[0,08;2,17]	0,25	0,304
Amicacina	Idade jovem	2,78	[0,89;8,61]	1,60	0,077
	Idade sénior	0,24	[0,03;2,49]	0,29	0,234
	Acesso livre exterior	0,26	[0,06;0,96]	0,17	0,043
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,26	[0,07;0,92]	0,17	0,036
Ampicilina	Idade jovem	4,13	[1,13;15,18]	2,74	0,033
	Idade sénior	0,67	[0,11;4,17]	0,62	0,665
	Acesso livre exterior	0,19	[0,05;0,71]	0,13	0,014
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,11	[0,01;0,94]	0,12	0,044
Amoxicilina + Ácido clavulânico	Idade jovem	3,90	[1,23;13,37]	2,30	0,021
	Idade sénior	0,30	[0,03;3,07]	0,36	0,310
	Acesso livre exterior	0,16	[0,04;0,66]	0,12	0,011
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,17	[0,04;0,66]	0,12	0,011
Cefalexina	Idade jovem	1,51	[0,00;-]	4,45	0,995
	Idade sénior	0,35	[0,04;2,87]	0,38	0,330
	Acesso livre exterior	0,14	[0,02;0,96]	0,14	0,046
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,00	[0,00;-]	0,00	0,994
Cefotaxima	Idade jovem	2,60	[0,84;8,07]	1,50	0,098
	Idade sénior	0,37	[0,04;3,84]	0,44	0,406
	Acesso livre exterior	0,15	[0,03;0,74]	0,12	0,020
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,22	[0,07;0,73]	0,13	0,013
Cloranfenicol	Idade jovem	2,44	[0,79;7,50]	1,40	0,118
	Idade sénior	0,61	[0,09;4,14]	0,60	0,614
	Acesso livre exterior	0,16	[0,04;0,66]	0,12	0,011
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,26	[0,07;0,92]	0,17	0,036
Enrofloxacin	Idade jovem	6,11	[1,76;21,18]	3,87	0,004
	Idade sénior	0,61	[0,09;4,14]	0,60	0,614
	Acesso livre exterior	0,23	[0,06;0,82]	0,15	0,023
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,16	[0,03;0,80]	0,13	0,026
Estreptomicina	Idade jovem	2,92	[0,94;9,10]	1,69	0,065
	Idade sénior	0,93	[0,14;6,40]	0,91	0,940
	Acesso livre exterior	0,23	[0,06;0,92]	0,16	0,038
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,38	[0,12;1,20]	0,22	0,098
Gentamicina	Idade jovem	2,65	[0,86;6,16]	1,52	0,089
	Idade sénior	0,30	[0,03;3,07]	0,36	0,310
	Acesso livre exterior	0,21	[0,05;0,85]	0,15	0,029
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,29	[0,09;0,96]	0,18	0,043
Imipenem	Idade jovem	2,40	[0,72;8,02]	1,48	0,155
	Idade sénior	0,60	[0,06;6,44]	0,73	0,673
	Acesso livre exterior	0,00	[0,00;-]	0,00	0,992
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,21	[0,07;0,68]	0,13	0,009
Tetraciclina	Idade jovem	3,00	[0,46;19,69]	2,88	0,252
	Idade sénior	0,09	[0,01;0,72]	0,09	0,023
	Acesso livre exterior	0,14	[0,04;0,65]	0,11	0,012
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,26	[0,03;2,29]	0,29	0,227
Trimetoprim + Sulfametoxazol	Idade jovem	1,88	[0,56;6,31]	1,16	0,304
	Idade sénior	0,27	[0,04;1,86]	0,27	0,183
	Acesso livre exterior	0,42	[0,12;1,49]	0,27	0,179
	Tutor frequente hospital medicina humana	0,20	[0,04;0,97]	0,16	0,046